



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

POLIMORFISME GEN HORMON PERTUMBUHAN PADA SAPI PESISIR SUMATERA BARAT

DISERTASI



**YURNALIS
07301008**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG 2013**

POLIMORFISME GEN HORMON PERTUMBUHAN PADA SAPI PESISIR SUMATERA BARAT

**OLEH
YURNALIS**

BP. 07 301 008

PEMBIMBING

**Dr. Ir. SARBAINI, M.Sc
Prof. Dr. Ir. Hj. ARNIM, MS
Prof. Dr. sc.agr. Ir. JAMSARI, MP.**

DISERTASI

**Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar Doktor Ilmu Ilmu
Pertanian Pemusatan Ilmu Ternak Pada Program Pascasarjana
Universitas Andalas Padang**



**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS ANDALAS
2013**

POLIMORFISME GEN HORMON PERTUMBUHAN PADA SAPI PESISIR SUMATERA BARAT.

RINGKASAN

Tujuan penelitian ini adalah untuk (1) mengetahui polimorfisme sekuen gen hormon daerah exon 3 sampai daerah flanking 3' pada Sapi Pesisir (2) untuk mengetahui hubungan polimorfisme gen GH dengan bobot badan (3) untuk mengetahui kesamaan atau homologi gen bGH bangsa Sapi Pesisir dengan bangsa-bangsa sapi lain yang ada di *NCBI (National Center for Biotechnology Information) GenBank*.

Penelitian lapangan untuk memperoleh data bobot badan sapi Pesisir umur 1,5 tahun dilakukan di Kabupaten Pesisir Selatan Sumatera Barat dari bulan Maret sampai Juni 2009. Penelitian laboratorium ditujukan untuk mempelajari keragaman sekuen gen hormon pertumbuhan menggunakan empat pasang primer: GH4, GH5, GH6, dan GH7 dilakukan di Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman, Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas pertanian Universitas Andalas dari bulan Juni 2009 sampai Agustus 2010 dan Laboratorium Genetika Kassel University Jerman dari Oktober 2010 sampai Januari 2011, dan sekuensing dilakukan di SeqLab Gottingen Jerman.

Hasil analisis bobot badan Sapi Pesisir mempunyai keragaman berat badan dan ukuran-ukuran tubuh yang sangat tinggi sehingga berpeluang untuk ditingkatkan melalui seleksi.

Sekuensing hasil PCR dari ke empat fragmen memperlihatkan sapi Pesisir mempunyai keragaman gen GH yang tinggi dimana dibandingkan dengan *NCBI GenBank* acces nomor M57464.1 pada ke 4 fragmen yang diteliti ditemukan 18 delesi, 15 insersi dan 21 mutasi.

Dari 18 delesi pada gen GH sapi Pesisir 6 diantaranya spesifik pada sapi Pesisir karena terjadi pada semua sampel dan belum pernah terjadi pada gen sapi yang terdapat di *NCBI GenBank* yaitu delesi A pada posisi 1408, delesi G pada posisi 1410, delesi T pada posisi 1412, delesi C pada posisi 1414/1415, delesi A pada posisi 1429, dan delesi T pada posisi 2432. Dari 18 delesi ini 10 diantaranya bersifat polimorfik dan 8 lainnya bersifat monomorfik.

Dari 15 insersi pada gen GH sapi Pesisir 2 diantaranya spesifik pada sapi Pesisir karena terjadi pada semua sampel dan belum pernah terjadi pada gen sapi yang terdapat di *NCBI GenBank* yaitu insersi G pada posisi 1549-1551, insersi C pada posisi 1895. Dari 15 insersi ini 4 diantaranya bersifat polimorfik dan 11 lainnya bersifat monomorfik.

Dari 21 mutasi pada gen GH sapi Pesisir 3 diantaranya spesifik pada sapi pesisir karena terjadi pada semua sampel dan belum pernah terjadi pada gen sapi yang terdapat di *NCBI GenBank* yaitu mutasi T → G pada posisi 1947, mutasi C → G pada posisi 2639, dan mutasi C → A pada posisi 2813. Dari 21 mutasi ini 17 diantaranya bersifat polimorfik dan 4 lainnya bersifat monomorfik.

Hasil analisis dengan χ^2 memperlihatkan tidak adanya hubungan antara keragaman gen GH dengan dua kelompok bobot badan sapi pesisir.

Sekuen yang diperoleh mempunyai kesamaan yang tinggi dengan sekuen gen GH yang ada di *NCBI GenBank*, mempunyai kesamaan 97% - 99% dengan sekuen gen *NCBI GenBank* acces nomor M57464.1, dan sekuen Woichick et al., (1982) serta sekuen gen GH lainnya di *NCBI GenBank*.



POLIMORFISME GROWTH HORMONE GENE IN PESISIR CATTLE WEST SUMATERA

SUMMARY

The objective of this study were (1) to identify polymorphism of growth hormone gene and to characterize nucleotide changes and its position in the DNA sequence from exon three to 3' flanking region in Pesisir cattle (2) to determine the association between the polymorphism of growth hormone gene and body weight in Pesisir cattle (3) to determine the similarity or homology bGH gene in Pesisir cattle with others bGH gene in NCBI (National Center for Biotechnology Information) GenBank.

Body weight and blood sample of 1.5 years old Pesisir cattle were collected from Pesisir Selatan Distric of West Sumatera Provinces from Maret to June 2009. Laboratory research aimed to study the polimorphism of growth hormone gene sequences using four pairs of primers: GH4, GH5, GH6, and GH7 performed at the Laboratory of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture Andalas University from June 2009 to August 2010 and the Laboratory of Genetics Kassel University Germany from October 2010 until January 2011, and sequencing were done in SeqLab Gottingen Germany.

The body weight of Pesisir cattle showed a high variability. This finding study suggested the body weight can improves through selection. The sequenced data from four PCR product showed high variability in bGH gene of Pesisir cattle. Comparing with NCBI GenBank Acess M57464.1. From four fragmen 18 deletions, 15 insertions, and 21 mutations were identified.

Of the 18 bGH gene deletion in the Pesisir cattle 6 are specific to these cattle because it occurs at all samples and not yet found in other sequeunce in NCBI GenBank, that are deletion of A at position 1408, deletion of G at position 1410, deletion of T at position 1412 , deletion of C at position 1414/1415, deletion of A at position 1429, and the deletion of T at position 2432. Of the 18 deletions 10 of them are polymorphic and 8 others are monomorphic.

Of the 15 insertions in the bGH gene Pesisir cattle, 2 of which were specific to these cattle since it occurs at all samples and not yet found in other bGH sequence in the NCBI GenBank, that are G insertion at position 1549-1551, C insertion at position 1895. From 15 insertion 4 of which are polymorphic and 11 are monomorphic.

Of the 21 mutations in the bGH gene Pesisir cattle 3 of which were specific to Pesisir cattle since it occurs at all samples and not yet found in other bGH sequence in the NCBI GenBank. The mutation are T → G mutation at position 1947, C → G mutation at position 2639, C → A mutation at position 2813. Of the 21 mutations are 17 of them are polymorphic and the other 4 are monomorphic.

The results of the χ^2 analysis showed no relationship between bGH gene polymorphisms and two weight groups of Pesisir cattle.

Sequences obtained have a high similarity with GH gene sequences available in the NCBI GenBank, has the same 97% - 99% with the NCBI

GenBank acces number M57464.1 and sequence Woichick et al., (1982), and other bGH gene in NCBI GenBank.



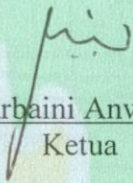
**Judul : Polimorfisme Gen Hormon Pertumbuhan
Pada Sapi Pesisir Sumatera Barat**

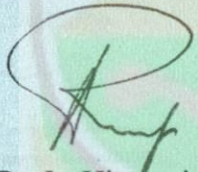
Nama Mahasiswa : Ir. Yurnalis, M.Sc
No. BP : 07301008
Program Studi : Ilmu Ilmu Pertanian
Pemusatan : Ilmu Ternak

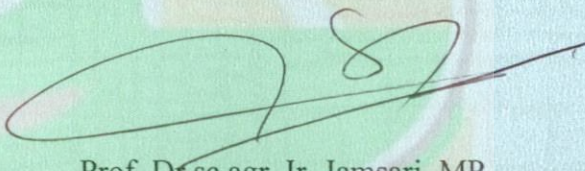
Disertasi ini telah diuji dan dipertahankan di depan panitia sidang ujian Tertutup Disertasi (S3) Program Pascasarjana Universitas Andalas dan dinyatakan Lulus pada tanggal 3 Januari 2013

Menyetujui:

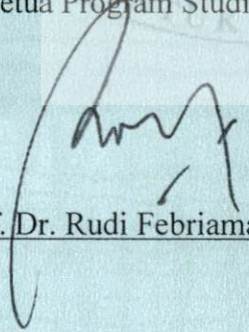
1. Komisi Pembimbing


Dr. Ir. Sarbaini Anwar, M.Sc
Ketua

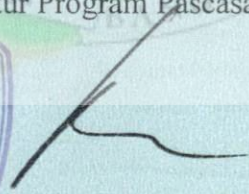

Prof. Dr. Ir. Hj. Arnim, MS
Anggota


Prof. Dr.sc.agr. Ir. Jamsari, MP.
Anggota

2. Ketua Program Studi


Prof. Dr. Rudi Febriamansyah, MSc

3. Direktur Program Pascasarjana


Prof. Dr. Syafruddin Karimi, SE, MA



PERNYATAAN MENGENAI DISERTASI DAN SUMBER INFORMASI

Dengan ini saya menyatakan bahwa disertasi dengan judul “**Polimorfisme Gen Hormon Pertumbuhan Pada Sapi Pesisir Sumatera Barat**” adalah karya saya sendiri dengan bimbingan dan arahan dari komosi pembimbing dan belum diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka di bagian akhir disertasi ini.

Padang, Januari 2013

Yurnalis
BP. 07031008



RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di Solok, Sumatera Barat pada tanggal 11 Mei 1954. Penulis merupakan anak keempat dari delapan bersaudara dari pasangan ayah Syofyan Dt.Pangulu Basa (alm) dan ibu Zuiyar (alm).

Penulis menyelesaikan pendidikan dasar di Sekolah Dasar Negeri No. 2 Kotamadya Bukittinggi pada tahun 1966, pendidikan menengah pertama di SMP Negeri IV Kotamadya Bukittinggi pada tahun 1969, dan sekolah menengah atas di SMA Negeri 1 Bukittinggi tahun 1972. Pada tahun 1973 penulis diterima di Fakultas Peternakan Universitas Andalas dan memperoleh gelar Sarjana (Ir) pada tahun 1982. Pada tahun 1987 penulis mengikuti pendidikan pascasarjana di *Institute of Mathematic and Statistics, University of the Philippines at Los Banos* dan memperoleh gelar *Master of Science* dalam bidang Statistik pada tahun 1989.

Sejak tahun 1983 penulis diterima bekerja sebagai dosen pada Fakultas Peternakan Universitas Andalas Padang, dan terhitung semenjak tahun 2007 penulis mengikuti program Doktor pada Program Studi Ilmu Ternak – Program Pascasarjana Universitas Andalas.

Penulis menikah dengan Selfiana pada tahun 1984 dan dikaruniai seorang putra Adytia Yurnalis.

Padang, Januari 2013

Penulis
Yurnalis

KATA PENGANTAR

Pertama-tama penulis memanjatkan puji dan syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penelitian dan karya ilmiah ini berhasil diselesaikan. Seiring dengan itu penulis mempersembahkan salawat dan salam kepada arwah Nabi Muhammad SAW. Judul yang dipilih dalam penelitian yang dilaksanakan sejak bulan Maret 2009 sampai Januari 2011 ini ialah Polimorfisme Gen Hormon Pertumbuhan pada Sapi Pesisir Sumatera Barat.

Terima kasih disampaikan kepada Bapak Rektor Universitas Andalas dan Bapak Dekan Fakultas Peternakan Universitas Andalas yang telah memberikan izin tugas belajar kepada penulis. Terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada Bapak Dr. Ir. Sarbaini Anwar, MSc sebagai ketua komisi pembimbing, Ibu Prof. Dr. Ir. Hj. Arnim, MS dan Bapak Prof. Dr.sc.agr. Ir. Jamsari, MP selaku anggota komisi pembimbing. Ungkapan terima kasih ini juga penulis sampaikan kepada Bapak Bupati Kepala Daerah Tingkat II Kabupaten Pesisir Selatan, yang telah memberikan izin penelitian kepada penulis di daerah ini. Kemudian ucapan terima kasih ini juga penulis sampaikan kepada Bapak Kepala Dinas Pertanian / Kasubdin Peternakan Kabupaten Pesisir Selatan, beserta petugas lapangannya yang telah banyak membantu penulis dalam pelaksanaan penelitian ini. Terima kasih juga disampaikan kepada Bapak Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Kementrian Pendidikan Nasional yang telah memberikan beasiswa dan bantuan biaya penelitian kepada penulis. Terima kasih sekali lagi disampaikan kepada Bapak Prof. DR.sc.agr. Ir. Jamsari, MP yang telah memberikan izin pemakaian fasilitas Laboratorium yang seluas-

luasnya kepada penulis. Terima kasih juga disampaikan kepada Prof. Wolfgang Nellen dari Universitas Kassel Jerman yang telah bersedia menerima penulis untuk mengikuti sandwich-like program di laboratorium genetik yang dipimpinnya, sehingga penelitian bisa diselesaikan.

Terima kasih juga disampaikan kepada Bapak Direktur Program Pascasarjana Universitas Andalas beserta seluruh jajarannya yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk mengikuti program Doktorat pada Program Pascasarjana Universitas Andalas beserta pelayanan selama studi penulis. Ucapan terima kasih ini juga penulis sampaikan kepada para Dosen yang telah banyak memberikan bekal ilmu yang sangat berarti dalam memperluas wawasan keilmuan baik selama maupun setelah studi penulis.

Beriring dengan itu penulis mendoakan kepada Allah S.W.T semoga Allah mengampuni segala dosa dan mengasihi ke dua almarhum orang tua penulis. Penulis mengucapkan terima kasih sebesar-besarnya kepada istriku Selfiana dan putraku Adytia Yurnalis atas pengorbanannya dan kesabarannya selama penulis menjalani pendidikan. Terakhir, terima kasih kepada semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah banyak membantu sehingga penelitian dan karya ilmiah ini dapat diselesaikan.

Penulis berharap semoga karya ilmiah ini bermanfaat terutama bagi penulis serta para pembaca sekalian.

Padang, Januari 2013

Penulis,

Yurnalis
BP. 07301008

DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN	iii
KATA PENGANTAR.	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
I. PENDAHULUAN.	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2. Perumusan Masalah	6
1.3. Tujuan Penelitian	6
1.4. Hipotesis Penelitian	6
1.5. Kegunaan	8
II. TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1. Sapi Pesisir Sumatera Barat.	9
2.2. Hormon Pertumbuhan.	12
2.3. Gen Hormon Pertumbuhan.	14
2.4. Hubungan Keragaman Gen Hormon Pertumbuhan dengan Sifat ... Produksi.	17
2.5. Penanda Molekuler	20
2.6. Polimorfisme Nucleotida Tunggal (SNP)	22
III. BAHAN DAN METODE	26
3.1. Penelitian Lapangan	26
3.1.1. Tempat dan Waktu.....	26

3.1.2. Bahan dan Alat.....	26
3.1.3. Metode Penelitian.....	28
3.1.3.1. Penarikan Sampel Ternak Sapi	28
3.1.3.2. Peubah dan Metode Pengukuran	28
3.2. Penelitian Laboratorium.....	29
3.2.1. Analisis variasi Sekuen.....	29
3.2.1.1. Tempat dan Waktu	29
3.2.1.2. Bahan dan Metoda.....	29
3.2.1.3. Peubah dan Metoda Analisis Variasi Sekuen	29
3.2.1.3.1. Peubah	29
3.2.1.3.2. Metoda Analisis Variasi Sekuen	30
a. Isolasi DNA Total	30
b. Amplifikasi Fragmen Gen Hormon Pertumbuhan	31
c. Gel Purifikasi Gel	32
d. Sekuensing	33
3.3. Analisis Data	34
3.3.1. Frekuensi Genotip	34
3.3.2. Uji χ^2 (Chi-Square)	35
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	36
4.1. Tinjauan Daerah Penelitian	36
4.2. Rata-rata Berat Badan Pesisir Umur 1,5 Tahun pada Kedua.....	37
Kelompok Berat Badan	
4.3. Isolasi Dna Total	38
4.4. Amplifikasi Fragmen Gen Hormon Pertumbuhan	41
4.4.1. Amplifikasi Daerah Exon3 Intron 3 dengan Pasangan	41

Primer GH4L dan GH4R	
4.4.2. Amplifikasi Daerah Exon 4, Intron 4, dan Exon5 dengan ... Pasangan Primer GH5L dan GH6R	48
4.4.3. Amplifikasi Sebagian Daerah Intron 4 dan Exon 5 dengan.. Pasangan Primer GH6L dan GH6R	55
4.4.4. Amplifikasi Daerah Flanking 3' Gen GH dengan Pasangan Primer GH7L dan GH7R 72	57
4.5. Keragaman Sekuen dan Frekuensi Alel.	61
4.5.1. Polimorfisme Daerah Exon 3 dan Intron 3.....	61
4.5.2. Polymorfisme Daerah Exon 4 dan Sebahagian Intron 4....	69
4.5.3. Polimorfisme Daerah Exon 5	73
4.5.4. Polimorfisme Daerah Ujung Gen GH	76
4.6. Kesamaan Sekuen dengan Sekuen Lainnya.....	87
VI. KESIMPULAN DAN SARAN.	93
Kesimpulan.	93
Saran.	93
DAFTAR PUSTAKA	94
LAMPIRAN	108

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Sekuen dan posisi oligonukleotida yang digunakan untuk PCR gen hormon pertumbuhan pada sapi Pesisir.	31
Tabel 4.1. Rata-rata bobot badan sapi pada kedua kelompok	37
Tabel 4.2. Polimorfisme sekuen fragmen GH4	62
Tabel 4.3. Polimorfisme sekuen fragmen GH5	69
Tabel 4.4. Polimorfisme sekuen fragmen GH6	73
Tabel 4.5. Polimorfisme sekuen fragmen GH7	77



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Kerangka pemikiran penelitian	7
Gambar 2. Sekuen gen hormon pertumbuhan (bGH) pada sapi <i>Bos taurus</i> dari Gen Bank akses nomor M57764.1 (Gordon, <i>et al</i> , 1983)	16
Gambar 3. <i>Flowchart</i> penelitian	27
Gambar 4. Elektroforesis DNA total hasil isolasi menggunakan Genomik DNA Purification Kit dari Promega	39
Gambar 5. Elektroforesis hasil penyamaan konsentrasi Sampel (10 ng/μl)	40
Gambar 6. Posisi dan panjang fragmen untuk masing-masing pasangan primer (GH4 – GH7) berdasarkan sekuen Gordon <i>et al.</i> (1983)	41
Gambar 7. Elektroforesis 2 μl fragmen Intron 3 Exon 3 Gen GH hasil ... amplifikasi dengan pasangan primer GH4L dan GH4R	41
Gambar 8. Sekuen gen GH Intron 3 Exon 3 hasil amplifikasi dengan ... pasangan primer GH4L dan GH4R	43
Gambar 9. Elektroforesis 25 μl produk PCR gen hormon pertumbuhan intron 3 exon 3 hasil amplifikasi menggunakan pasangan primer GH4L dan GH4R	44
Gambar 10. Elektroforesis 25 μl produk PCR gen hormon pertumbuhan intron 3 exon 3 hasil amplifikasi menggunakan pasangan primer GH4L dan GH4R hasil purifikasi	45
Gambar 11. <i>Elektroforegram</i> hasil Sekuensing gen hormon pertumbuhan Intron 3 Exon 3 hasil amplifikasi menggunakan pasangan primer GH4L dan GH4R kualitas baik (A) dan kualitas jelek (B).	46
Gambar 12. Beberapa kesalahan pembacaan mesin Sekuencer	48
Gambar 13. Elektroforesis 2 μl produk PCR gen hormon pertumbuhan exon 4, intron 4, dan exon5 hasil amplifikasi menggunakan pasangan primer GH5L dan GH6R	49

Gambar 14. Elektroforesis 25 µl produk PCR gen hormon pertumbuhan. exon 4 intron 4 exon 3 hasil amplifikasi menggunakan pasangan primer GH5L dan GH6R	50
Gambar 15. Elektroforesis 2 µl produk PCR hasil amplifikasi Gen GH.... daerah Exon 4 dan sebagian Intron 4 dengan pasangan primer GH5L dan GH5R.	52
Gambar 16. Elektroforesis 25 µl produk PCR gen hormon pertumbuhan. daerah exon 4 dan sebahagian intron 4 menggunakan primer GH5L dan GH5R	52
Gambar 17. Elektroforesis 2 µl produk PCR gen hormon pertumbuhan... daerah exon 4 dan sebahagian intron 4 menggunakan primer GH5L dan GH5R hasil purifikasi	53
Gambar 18. <i>Elektroforegram</i> hasil Sekuensing gen GH daerah exon 4..... dan sebahagian intron 4 hasil amplifikasi menggunakan primer GH5L dan GH5R kualitas bagus dan kualitas jelek.	54
Gambar 19. Elektroforesis 2 µl hasil amplifikasi sebagian daerah..... intron 4 dan exon 5 dengan pasangan primer GH6L dan GH6R.	56
Gambar 20. <i>Elektroforegram</i> hasil Sekuensing sebahagian daerah intron 4 dan exon 5 hasil amplifikasi menggunakan primer GH6L dan GH6R	57
Gambar 21. Elektroforesis 2 µl hasil amplifikasi daerah ujung gen GH dengan pasangan primer GH7L dan GH76R.	59
Gambar 22. Elektroforesis 25 µl hasil amplifikasi daerah ujung gen GH dengan pasangan primer GH7L dan GH7R	59
Gambar 23. Elektroforesis 2 µl hasil amplifikasi daerah ujung gen GH dengan pasangan primer GH7L dan GH7R hasil purifikasi	60
Gambar 24. <i>Elektroforegram</i> hasil Sekuensing daerah ujung gen GH 69 hasil amplifikasi menggunakan primer GH7L dan GH7R.	61
Gambar 25. Delesi pada posisi 1408 – 1429	64
Gambar 26. Insersi pada Posisi 1467, 1481 dan mutasi pada posisi 1482	65

Gambar 27. Inseri pada posisi 1508, 1521, 1525, 1539, 1541, mutasi G → T pada posisi 1524 dan mutasi G → C pada posisi 1537	66
Gambar 28. Inseri T dan G pada posisi 1541 dan 1548, dan mutasi C → T pada posisi 1547 dan 1578.	66
Gambar 29. Delesi pada posisi 1740, 1743, 1745, 1747, 1749, 1753, dan 1754	70
Gambar 30. Inseri A pada posisi 1752 dan inseri C pada posisi 1754.... dan 1790	71
Gambar 31. Inseri C, mutasi C → G, dan mutasi G → A pada posisi..... 1895, 1914, dan 1930	72
Gambar 32. Mutasi T → G, T → C, dan A → G pada posisi 1947, 1980, dan 2025	72
Gambar 33. Mutasi C → T dan C → A pada posisi 2230 dan 2291.....	75
Gambar 34. Inseri pada posisi 2379, 2386, dan 2393	76
Gambar 35. Keragaman pada posisi 2432,2433, 2436, 2437,2449, 2459, dan 2537	78
Gambar 36. Keragaman pada posisi 2567, 2639, 2647, dan 2813	79
Gambar 37. Keragaman pada posisi 2703, 2710, 2732, dan 2813	79
Gambar 38. Dendogram fragmen GH4	81
Gambar 39. Dendogram fragmen GH5	83
Gambar 40. Dendogram fragmen GH6	85
Gambar 41. Dendogram fragmen GH7	86
Gambar 42. Perbandingan urutan asam amino pada daerah exon 3 dengan Sekuen Gordon <i>et al.</i> (1983)	88
Gambar 43. Perbandingan urutan asam amino pada daerah exon 4..... dengan sekuen Gordon <i>et al.</i> (1983)	90

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Penelitian

Sapi Pesisir merupakan sapi asli yang berkembang di daerah Pesisir Selatan Sumatera Barat dan telah beradaptasi dengan baik dengan kondisi daerah pesisir. Saladin (1983) menduga Sapi Pesisir sebagai sisa sapi asli yang pada mulanya berkembang di Kabupaten Pesisir Selatan. Sapi Pesisir mempunyai potensi genetik yang baik karena mempunyai daya adaptasi tinggi, baik terhadap pakan yang berkualitas rendah, maupun terhadap perubahan suhu lingkungan sehingga Sapi Pesisir jarang sekali terserang penyakit, sehingga berperan besar bagi peternak di kawasan pesisir Sumatera Barat. Kemampuan beradaptasi Sapi Pesisir dapat membuka peluang sapi ini dikembangkan di kawasan pesisir.

Sapi Pesisir pada umumnya dipelihara secara bebas (berkeliraran) dan masih sangat sedikit perhatian peternak dalam pemeliharaannya. Sapi Pesisir memainkan peranan penting sebagai sumber daging bagi masyarakat di Kota Padang dan juga merupakan ternak yang populer untuk kebutuhan hewan kurban pada hari raya Idul Adha karena tubuhnya yang kecil. Konsumen lebih menyukai Sapi Pesisir, karena struktur dagingnya yang halus dan rasanya gurih. Menurut Dinas Peternakan Kabupaten Pesisir Selatan pada tahun 2008 populasi sapi di Pesisir Selatan 84.000 ekor sebahagian besar adalah sapi lokal pesisir, dengan jumlah peternak 35.000 KK, dan populasi terbanyak pada Kecamatan Lengayang (16.000 ekor) dan Bayang (14.000 ekor).

Sapi ini ukuran badannya relatif lebih kecil dibanding sapi-sapi jenis lainnya, seperti Peranakan Ongole, Sapi Bali, Sapi Madura, Sapi Aceh. Meskipun

tergolong sapi kecil, Sapi Pesisir memiliki persentase karkas cukup tinggi. Menurut Saladin (1983) persentase karkas Sapi Pesisir adalah 50,6%, sedangkan hasil penelitian Khasrat (2006) Sapi Pesisir yang diberi 75% konsentrat ditambah 25% jerami amoniasi persentase karkasnya 53%. Persentase karkas ini lebih tinggi dari persentase karkas Sapi Ongole (48,8%), Sapi Madura (47,2%), Sapi PO (45%) dan kerbau (39,3%), namun sedikit lebih rendah dari persentase karkas Sapi Bali (56,9%). Persentase karkas tersebut menunjukkan kemampuan Sapi Pesisir sebagai “pabrik” protein hewani karena mampu mengubah hijauan (rumput) menjadi daging yang dapat dimakan manusia. Oleh karena itu Sapi Pesisir ini sangat potensial untuk dikembangkan.

Seleksi yang terjadi pada Sapi Pesisir adalah seleksi yang berjalan kearah yang negatif yaitu ada kecendrungan sapi yang dipertahankan oleh peternak adalah sapi yang bobot badannya lebih kecil, sedangkan sapi yang berbobot badan lebih besar dijual untuk mendapatkan harga yang lebih tinggi. Hal ini terjadi karena tingginya permintaan terhadap Sapi Pesisir terutama menjelang Hari Raya Idul Adha. Perbaikan genetik berpeluang untuk memacu peningkatan produktivitas dan kenaikan populasi ternak Sapi Pesisir. Namun demikian informasi mengenai Sapi Pesisir masih sangat terbatas, khususnya mengenai aspek biologis dan genetiknya, oleh karena itu dibutuhkan studi yang lebih komprehensif. Untuk meningkatkan performa Sapi Pesisir disamping perbaikan sistem pemeliharaan, meningkatkan kondisi lingkungan seperti daya dukung lahan, juga harus dilakukan seleksi yang tepat.

Salah satu gen yang diduga memiliki pengaruh terhadap pertumbuhan (bentuk dan ukuran) dari semua bangsa sapi termasuk pada Sapi Pesisir adalah gen hormon pertumbuhan (*bovine growth hormon gene* = bGH). Gen hormon pertumbuhan pada sapi berperan penting dalam proses biologis seperti perkembangan kelenjar susu, laktasi, pertumbuhan dan mengatur metabolisme (Etherton, 1998). Gen hormon pertumbuhan pada sapi pedaging merupakan salah satu gen kandidat yang berhubungan dengan bobot hidup (Reis *et al.*, 2001), penambahan bobot badan (Tambasco *et al.*, 2003) yang mengkode dan menghasilkan hormon pertumbuhan untuk mengatur pertumbuhan dan perkembangan sel ternak (Pierzchala *et al.*, 2004). Selain itu gen hormon pertumbuhan berperan sebagai pengatur utama pertumbuhan setelah lahir dan proses metabolisme yang dapat mempengaruhi laju pertumbuhan, komposisi tubuh, kesehatan, produksi susu dan penuaan melalui penyesuaian dengan gen-gen lain (Ge *et al.*, 2003).

Gen bGH terletak di kromosom 19 pada posisi 19q26-qter (Woychik *et al.*, 1982; Hediger *et al.*, 1990) dan memiliki ukuran panjang urutan (*sequence*) nukleotida sebesar 2856 *base pair* (bp) yang terdiri atas lima exon dan dipisahkan oleh empat intron (Woychick *et al.*, 1982; Gordon *et al.*, 1983).

Gen bGH diketahui memiliki keragaman yang tinggi. Ferraz *et al.* (2006) mendapatkan adanya variasi pada posisi 160, 161 dimana GT diganti dengan CTG, adanya delesi pada posisi 191 dan 193, dan pergantian T menjadi C pada posisi 247 dan 297 jika dibandingkan dengan sekuen bGH1 Gordon *et al.* (1983). Zang *et al.* (1992 dan 1993) menemukan tempat polimorfisme untuk enzim pemotong *MspI* terletak pada intron 3 dengan posisi 1547, sedangkan Lucy *et al.*,

(1991) mendapatkan dua bentuk polimorfisme pada exon ke-5 dengan enzim pemotong *AluI* yaitu terdapatnya substitusi *cytosine (C)* menjadi *guanine (G)* yang menyebabkan perubahan asam amino dari *leucine (L, kodon CTG)* menjadi *valine (V, kodon GTG)* pada residu 127. Unanian *et al.*, (1994) dengan teknik PCR-RFLP juga menemukan adanya polimorfisme gen bGH dengan menggunakan enzim pemotong *HaeIII* yang terletak pada exon ke-5 dan daerah pengapitnya. Selanjutnya Zakizadeh *et al.*, (2006) mendapatkan polimorfisme fragmen bGH pada intron 3 dan exon 5 dengan menggunakan enzim pemotong *MspI*, *AluI* dan *DdeI*. Tatsuda *et al.* (2008) melaporkan adanya mutasi pada gen GH posisi 127 dan 172 exon 5 (*leucine₁₂₇, threonine₁₇₂*), (*valine₁₂₇, threonine₁₇₂*) and (*valine₁₂₇, methionine₁₇₂*).

Keterkaitan polimorfisme gen bGH dengan sifat-sifat produksi secara intensif telah dipelajari pada ternak sapi terutama polimorfisme pada intron 3 dan exon 5 dengan menggunakan teknik *Restriction Fragment Length Polymorphism* dikombinasikan dengan *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Telah banyak penelitian mengenai hubungan antara polimorfisme pada *locus* ini dengan sifat produksi seperti persentase protein susu (Lagziel *et al.*, 1996; Vukasinovic *et al.*, 1999). Polimorfisme pada exon 5 berhubungan dengan dua bentuk hormon dilaporkan oleh Lucy *et al.* (1991).

Dybus *et al.* (2002) dengan menggunakan enzim restriksi *AluI* menemukan adanya hubungan antara polimorfisme gen GH dengan produksi susu pada sapi *black-white* polandia dan mendapatkan adanya polimorfisme bGH/*AluI*-*MspI*. Selanjutnya Tatsuda *et al.* (2008) melaporkan berat karkas dan pelemakan rendah berhubungan dengan haplotip A (*leucine₁₂₇, threonine₁₇₂*), dan pelemakan daging akan ditingkatkan oleh haplotip C(*valine₁₂₇, methionine₁₇₂*). Reis *et al.*

(2001) melaporkan adanya hubungan polimorfisme bGH-*AluI* dengan pertumbuhan dan berat badan pada sapi Portugis. Polismorfisme bGH intron III pada Indian Zebu (*Bos indicus*) dengan enzim *MspI* telah diteliti oleh Sodhi *et al.* (2007) yang memperoleh dua alel (*MspI*- and *MspI*+). Telah diketahui bGH memegang peran penting pada proses biologis seperti perkembangan kelenjar susu, laktasi, pertumbuhan dan pengaturan metabolisme, sehingga merupakan kandidat gen marker untuk peningkatan produksi susu dan daging.

Polimorfisme bGH *AluI* (+/-) dipercaya berhubungan dengan konsentrasi GH plasma, dimana genotip LL biasanya berhubungan dengan tingginya sirkulasi GH jika dibandingkan dengan genotip LV (Schlee *et al.*, 1994). Chrenek *et al.* (1998) melaporkan adanya hubungan antara polimorfisme bGH-*AluI* dengan sifat produksi daging pada sapi Slovak Simmental. Barendse *et al.*, (2006) mendapatkan fragmen GH1:c.457C alel berhubungan dengan pelemakan rendah.

Penemuan tersebut akan memberikan hasil dan harapan baru dalam upaya perbaikan mutu genetik ternak sapi seperti Sapi Pesisir. Apabila polimorfisme bGH menunjukkan keterkaitan dengan sifat-sifat produksi yang menguntungkan terutama sifat-sifat yang ekonomis, maka penciri tersebut dapat digunakan sebagai salah satu kriteria seleksi atau yang lebih populer dikenal dengan MAS (*Marker Assisted Selection*).

Penelitian pada Sapi Pesisir baru sebatas keragaman mikrosatelit (Sarbaini, 2006) dan keragaman GH-*AluI* dan GH-*MspI*, sedangkan keragaman sekuens lainnya pada Sapi Pesisir belum ada. Berdasarkan uraian tersebut, penelitian ini mencoba menganalisis keragaman sekuen gen GH pada Sapi Pesisir pada daerah Intron 3 sampai daerah ujung dari Gen GH. Penentuan keragaman

genetik ini dapat dipakai sebagai informasi awal dalam rangka untuk melakukan seleksi genetik Sapi Pesisir. Kerangka pemikiran penelitian dapat dilihat pada Gambar1.

1.2. Perumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas, maka dirumuskan masalah sebagai berikut:

1. Apakah terdapat polimorfisme sekuen gen bGH pada Sapi Pesisir?
2. Apakah ada hubungan polimorfisme gen bGH dengan bobot badan pada Sapi Pesisir ?
3. Apakah ada kesamaan sekuen bGH Sapi Pesisir dengan sekuen bGH sapi lainnya ?

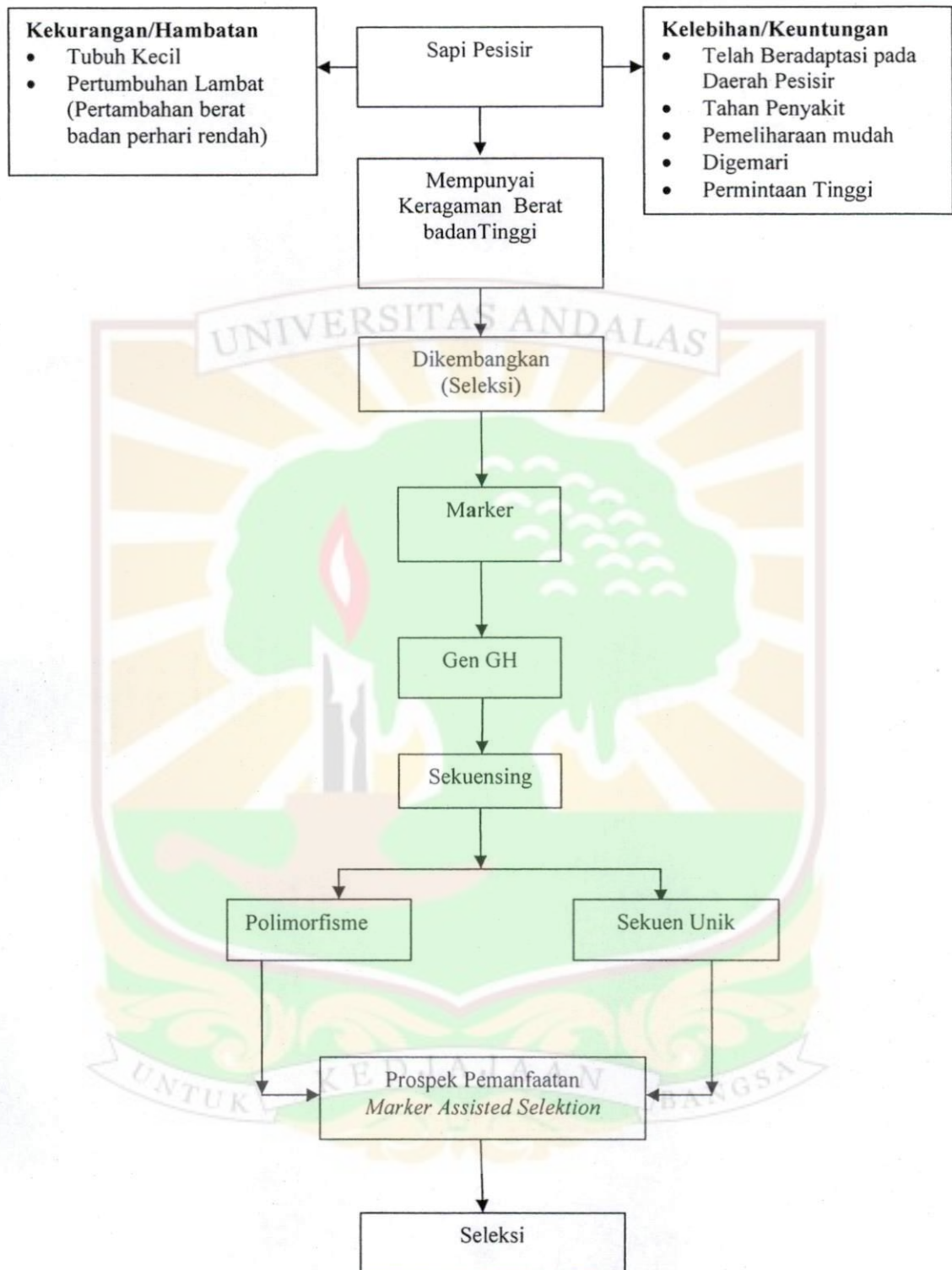
1.3. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian adalah :

1. Untuk mengetahui polimorfisme basa nukleotida sekuen DNA gen bGH daerah exon 3 sampai daerah flanking 3' pada Sapi Pesisir.
2. Untuk mengetahui hubungan polimorfisme gen bGH dengan bobot badan.
3. Untuk mengetahui kesamaan atau homologi gen bGH Sapi Pesisir dengan sapi lainnya

1.4. Hipotesis Penelitian

Terdapat hubungan polimorfisme gen bGH dengan bobot badan Sapi Pesisir.



Gambar 1. Kerangka pemikiran penelitian

1.5. Kegunaan

Hasil penelitian ini diharapkan menjadi informasi dasar untuk sistim deteksi dini untuk seleksi yang didasarkan pada *Marker Assisted Selection (MAS)* dan sekuen yang diperoleh juga berfungsi sebagai database sekuen gen hormon pertumbuhan Sapi Pesisir sebagai sumber daya genetik ternak lokal Indonesia



II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Sapi Pesisir Sumatera Barat.

Bangsa Sapi Pesisir Sumatera Barat merupakan salah satu bangsa sapi lokal Indonesia (DGLS, 2002; Martojo, 2003) yang terdapat di sepanjang Pesisir Barat Sumatera Barat. Menurut Schlegel dan Muller (1810) yang diacu dalam Merkens (1926) di Pantai Barat Daya Sumatera yakni di Padang dan dataran tinggi sekitarnya terdapat sapi dengan penampilan yang berbeda dari sapi yang ada di Pulau Jawa. Sapi-sapi tersebut jauh lebih kecil dan pendek badannya, kaki-kakinya lebih ramping, dan keseluruhan bangun tubuhnya tampak lebih indah dibanding sapi di Jawa. Sapi jantannya jarang memiliki punuk yang sebenarnya (berpunuk kecil).

Untuk meningkatkan mutu genetik sapi lokal sejak 1907 telah dimasukkan Sapi-sapi Zebu (Ongole dan Hisar) ke Sumatera Barat. Setelah kemerdekaan dimasukkan lagi Sapi Ongole dalam rangka Ongolisasi. Akan tetapi terbatasnya sarana perhubungan di Bagian Selatan Sumatera Barat pada waktu itu terutama di Kabupaten Pesisir Selatan, program Ongolisasi tidak berjalan seperti di daerah Kabupaten Agam, Kabupaten Tanah Datar dan Kabupaten Lima Puluh Kota. Oleh karena itu sapi lokal di Pesisir Selatan tidak terkontaminasi oleh Program Ongolisasi (Saladin, 1983).

Sapi Pesisir memiliki penampilan dengan bentuk dan ukuran tubuh kecil dibandingkan dengan sapi lokal lainnya seperti bangsa Sapi Bali, Sapi Ongole, Sapi Madura dan Sapi Aceh (Saladin, 1983; Sarbaini, 2004). Wilayah sentra populasi Sapi Pesisir yang masih dianggap masih terjaga kemurniannya adalah Kabupaten Pesisir Selatan. Hal ini dikarenakan Sapi Pesisir yang terdapat di

Kabupaten lainnya telah mengalami program persilangan yang intensif sehingga bobot badan dan ukuran-ukuran tubuhnya lebih tinggi dibanding dengan Sapi Pesisir yang terdapat di Kabupaten Pesisir Selatan (Sarbaini, 2004).

Sapi Pesisir memiliki pola warna bulu tunggal yang dikelompokkan atas lima warna utama, yaitu merah bata (34,35%), kuning (25,51%), hitam (10,91%) dan putih (9,26%) (Sarbaini, 2004). Disamping itu Sapi Pesisir mempunyai temperamen jinak hingga mudah dikendalikan, karakteristik lainnya berpunuk kecil sampai sedang, tanduk pendek dan mengarah keluar, seperti tanduk kambing (Saladin, 1983).

Sapi ini ukuran badannya relatif lebih kecil dibanding sapi-sapi lokal lainnya, seperti peranakan Ongole, Sapi Bali, Sapi Madura, Sapi Aceh, sehingga tergolong sapi mini (*mini cattle*).

Menurut Saladin (1983) rata-rata bobot badan Sapi Pesisir jantan dewasa umur 1 -2 tahun dan umur 3 - 3,5 tahun memiliki bobot badan 190,9 kg dan 233,1 kg. Sedangkan hasil penelitian Sarbaini (2004) berat Sapi Pesisir Jantan pada umur yang sama hanya mencapai 131,95 kg dan 168,87 kg jauh lebih rendah dari bobot badan dewasa Sapi Bali (310 kg) dan Sapi Madura (248 kg). Berdasarkan data dari dua penelitian ini dapat disimpulkan bahwa telah terjadi penurunan bobot badan Sapi Pesisir yang cukup besar dalam kurun waktu 20 tahun terakhir.

Penurunan berat badan ini diduga karena semakin menurunnya kualitas genetik sapi sebagai akibatnya telah terjadinya seleksi kearah negatif dimana sapi jantan terbaik dengan tubuh besar dijual demi untuk mendapatkan harga yang lebih baik, dan juga karena tingginya permintaan pasar terhadap Sapi Pesisir Jantan dewasa, terutama untuk keperluan hewan qurban dan semakin

berkurangnya peranan sapi jantan yang kuat dan besar dalam kehidupan masyarakat petani untuk mengolah tanah pertanian dan transportasi akibat semakin mudahnya mereka mendapatkan mesin pertanian serba guna (traktor tangan) untuk mengolah lahan pertanian baik dengan menyewa ataupun membeli sendiri (Sarbaini 2004)..

Meskipun tergolong sapi kecil, Sapi Pesisir memiliki persentase karkas cukup tinggi. Menurut Saladin (1983) persentase karkas Sapi Pesisir adalah 50,6%, sedangkan hasil penelitian Khasrat (2006) memperoleh persentase karkas 53% pada Sapi Pesisir yang diberi 75% konsentrat ditambah 25% jerami amoniasi. Persentase karkas ini lebih tinggi dari persentase karkas Sapi Ongole (48,8%), Sapi Madura (47,2%), Sapi PO (45%) dan kerbau (39,3%), namun sedikit lebih rendah dari persentase karkas Sapi Bali (56,9%).

Penampilan Sapi Pesisir yang relatif kecil di padang penggembalaan disamping karena faktor genetik juga sebagai akibat rendahnya kapasitas dan dukungan pakan yang tersedia di lahan penggembalaan umum. Jumlah ternak yang dilepas di padang penggembalaan umum tidak sebanding dengan luas dan kondisi lahan penggembalaan yang ada. Hasil pengamatan BPPT Sumbar pada tahun 2006 mengemukakan bahwa pertumbuhan anak sapi umur satu tahun (lepas sapih) di lapangan sangat rendah yaitu 15 gr/ekor/hari, dan pertumbuhan sapi muda umur 1,5 –2,5 tahun hanya bertumbuh 20 gr/ekor/hari, sehingga membuat anak sapi kerdil. (BPPT, 2008).

Hasil penelitian Warly et al. (1998) Sapi Pesisir yang diberi jerami amoniasi, yang dikombinasikan dengan limbah agroindustri (onggok, tepung

darah, ampas tahu dan dedak padi) menghasilkan pertambahan bobot badan 1,25 kg/hari dengan pemberian ransum 80% konsentrat + 20% jerami amoniasi.

Kajian molekuler terhadap Sapi Pesisir telah dilakukan oleh beberapa peneliti misalnya Sarbaini (2004) dengan menggunakan enam lokus penciri DNA mikrosatelit memperoleh keragaman yang tinggi pada populasi Sapi Pesisir di Kabupaten Pesisir Selatan. sehingga berpeluang untuk dilakukan seleksi. Kemudian Jakaria (2008) melakukan kajian terhadap keragaman gen GH Sapi Pesisir melalui teknik PCR-RFLP yang memperoleh keragaman tinggi (polimorfik) pada penciri PCR-*MspI* fragmen gen GH *MspI* dan rendah (monomorfik) pada penciri PCR-*AluI* fragmen gen GH.

2.2. Hormon Pertumbuhan.

Hormon Pertumbuhan adalah hormon polipeptida dari *pituitary* yang memainkan peran sentral pada pertumbuhan hewan dan metabolisme (Harvey *et al.*, 1995). Organ target utama GH adalah hati, dimana GH mengatur ekspresi beberapa gen. Beberapa penelitian mengenai ekspresi gen memperlihatkan GH mengatur ekspresi *insulin-like growth factor-I (IGF-I)* (Mathews *et al.*, 1986), *IGF binding protein (IGFBP)-1* (Seneviratne *et al.*, 1990), *IGFBP-3* (Lemmey *et al.*, 1997), *acid labile subunit (ALS)* dari *IGF binding complex* (Ooi *et al.*, 1997), *serine protease inhibitor (Spi) 2-1* (Yoon *et al.*, 1990), *suppressors of cytokine signaling (SOCS) gens* (Tollet-Egnell *et al.*, 1999), *phosphoenol pyruvate kinase C* dan *glucose transporter GLUT-2* (Valera *et al.*, 1993).

Hormon pertumbuhan secara dramatis mempengaruhi kerangka tubuh. Hormon ini juga mempengaruhi secara luas proses-proses metabolisme. Hormon ini memperkuat efektifitas sejumlah besar hormon lain, tampaknya pada

jaringan-jaringan sasaran bekerja dengan cara menghasilkan jenis lingkungan yang esensial agar hormon-hormon lain dapat bekerja dengan aktifitas penuh.

Hormon GH diketahui mempengaruhi reproduksi betina dan produksi susu (Hull and Harvey, 2001), metabolisme sodium dan air (Johannsson *et al.* 2002), meningkatkan pertumbuhan jaringan lunak pada kaki dan tangan, dan mempengaruhi fungsi jantung (Bollano *et al.*, 2000).

Efek metabolik GH diantaranya adalah meningkatkan sintesis protein, meningkatkan penggunaan lemak sebagai sumber energi dan menurunkan pemakaian glukosa (Guyton dan Hall, 1996). Adanya efek tersebut ditandai jika sekresi hormon pertumbuhan meningkat akan menyebabkan penurunan kandungan lemak tubuh dan meningkatkan kadar protein daging. Peningkatan hormon pertumbuhan akan diikuti oleh efek metaboliknya sehingga kadar lemak daging rendah dan tinggi protein. Pemberian hormon pertumbuhan secara *in vivo* akan menyebabkan peningkatan asam lemak bebas dan oksidasi asam lemak dalam hati (Murray *et al.*, 1996). Frohman (1995) juga melaporkan bahwa hormon pertumbuhan dapat meningkatkan mobilisasi asam lemak dari jaringan adiposa akibat meningkatnya proses lipolisis.

Peningkatan kadar hormon pertumbuhan akan meningkatkan efek metabolik berupa meningkatnya pengangkutan asam amino melalui membran sel, bertambahnya sintesis protein oleh ribosom, meningkatnya transkripsi DNA untuk membentuk RNA, menurunkan katabolisme protein dan asam amino (Guyton dan Hall, 1996). Hormon pertumbuhan sangat diperlukan untuk metabolisme protein (Murray *et al.*, 1996). Pemberian hormon pertumbuhan pada tikus akan menyebabkan meningkatnya total protein karkas (Byatt *et al.*, 1993). Biri-biri dan

sapi jantan yang diberi hormon pertumbuhan ternyata terjadi peningkatan sintesis protein otot (Vernin, 1989 dalam Demeyer dan Sejiana, 1991).

Hormon Pertumbuhan telah dibuktikan sebagai regulator utama pertumbuhan *postnatal* dan metabolisme pada mamalia sehingga mempengaruhi laju pertumbuhan, komposisi tubuh, kesehatan, produksi susu, dan penuaan dengan mengatur ekspresi banyak gen termasuk *insulin-like growth factor I (IGF-I)* (Sumantran *et al.*, 1992; Ho and Hoffman, 1993; Lincoln *et al.*, 1995).

2.3. Gen Hormon Pertumbuhan.

Salah satu gen yang diduga dan memiliki pengaruh terhadap pertumbuhan (bentuk dan ukuran) dari semua bangsa sapi termasuk pada Sapi Pesisir adalah gen hormon pertumbuhan (*growth hormon gene*) pada *bovine* (bGH). Gen bGH terletak di kromosom 19 pada posisi 19q26-qter (Woychik *et al.*, 1982; Hediger *et al.*, 1990) dan memiliki ukuran panjang urutan (*sequence*) nukleotida sebesar 2856 *base pair* (bp) yang terdiri atas lima exon dan dipisahkan oleh empat intron (Woychick *et al.*, 1982; Gordon *et al.*, 1983). Sekuen gen hormon pertumbuhan untuk bangsa sapi *Bos taurus* dapat dilihat pada Gambar 2.

Gen hormon pertumbuhan pada sapi berperan penting dalam proses biologis seperti perkembangan kelenjar susu, laktasi, pertumbuhan dan mengatur metabolisme (Etherton, 1998). Penelitian pada tikus memperlihatkan lebih banyak lagi ekspresi gen yang diatur oleh GH. Analisis ekspresi gen dengan cDNA array yang berisikan 588 cDNA tikus mengidentifikasikan delapan transkrip baru dari hati tikus yang diatur oleh GH (Thompson *et al.*, 2000). Menggunakan cDNA *microarray* yang mempresentasikan 3000 sekuens tikus, Flores-Morales *et al.*,

(2001) mendapatkan 58 dari 720 mRNA yang terdeteksi diatur oleh GH pada hati tikus, banyak diantaranya sebelumnya tidak diatur oleh GH.

Olsson *et al.* (2003) menggunakan *microarray* yang berisikan 11000 *expression sequence tags* (ESTs) tikus, mengidentifikasi 58 *metabolic genes* (yaitu gen yang ikut dalam proses metabolisme) yang ekspresinya di hati dirobah oleh ekspresi berlebih dari GH pada tikus transgenik. Sedangkan Ahluwalia *et al.* (2004) menggunakan *microarray* yang berisi 5889 gen unik tikus, mengidentifikasi 27 gen predominant betina – dan 44 gen predominant jantan yang diatur oleh GH pada hati tikus. Regulasi gen oleh GH termasuk metabolisme, detoxifikasi, kontrol pertumbuhan, dan fungsi lain oleh hati (Thompson *et al.*, 2000, Flores-Morales *et al.*, 2001, Olsson *et al.*, 2003, Ahluwalia *et al.*, 2004). Dengan demikian pengaturan ekspresi gen merupakan mekanisme utama GH dalam mempengaruhi fungsi hati.

Eleswarapu and Jiang (2005) menyatakan GH dapat mengatur ekspresi mRNA HNF-3 γ dan lima LETFs (*liver-enriched transcription factors*) lainnya termasuk HNF-3 β , HNF-6, HNF-4 α , C/EBP α , dan DBP pada hati sapi. Semua LETF ini berpotensi memediasi pengaturan gen lain oleh GH pada hati. Sehingga gen GH dan GHR adalah kandidat gen penting yang dapat digunakan sebagai penanda genetik untuk sifat pertumbuhan, karkas, dan produksi susu pada ternak (Ge *et al.*, 2003).

Pertumbuhan dan sifat karkas, yang dikontrol oleh banyak gen, adalah sifat yang penting secara ekonomi pada ternak. Seleksi ternak dengan pertumbuhan tinggi dan komposisi karkas yang baik sangat penting artinya bagi peternak dan konsumen. Teknologi mutakhir telah memungkinkan para ahli untuk

1	gtactggggt	gggttgccctt	tctcttctcc	aggggattta	tctgaccag	ggattgaacc
61	tgagtctcct	gcatttgcag	ctagattctt	tacggctgag	ccacctggga	agccatttcg
121	cttctgctgc	tgctgctgct	gctaagttgc	ttcagtcgtg	tccgacctgt	gcgacgcat
181	agacagcagc	ccaccaggtc	cccgtccctg	ggattctcca	ggcaagaaca	ttggagtggg
241	ttgccatttc	ctcctccaat	gcatgaaagt	gaaaagtga	agtgaagtca	ctcagttgtg
301	tccgaccctc	agcgacccca	tggactgcag	ccttccagaa	tggggtgcca	ttgccttctc
361	ctcgcttctg	ctacctcccc	tttaaaaaaga	aaacctatgg	ggtgggctct	caagctgaga
421	ccctgtgtgc	acagccctct	ggctgggtggc	agtggagacg	ggatgatgac	aagcctgggg
481	gacatgacct	cagagaagga	acgggaacag	gatgagttag	aggaggttct	aaattatcca
541	ttagcacagg	ctgccagtg	tccttgcata	aatgtataga	gcacacaggt	ggggggaaa
601	ggagagagag	aagaagccag	ggtataaaaa	tggccagca	gggaccaatt	ccaggatccc
661	aggaccagtc	tcaccagacg	actcagggtc	ctgtggacag	ctcaccagct	atgatggctg
721	caggtaagct	cgctaaaatc	ccctccattc	gcgtgtccta	aaggggtaat	gcggggggccc
781	ctgccgatgg	atgtgttcag	agctttgggc	tttagggctt	ccgaatgtga	acataggtat
841	ctacaccag	acatttggcc	aagtttgaaa	tgttctcagt	ccctggaggg	aagggtaggt
901	ggggctggca	ggagatcagg	cgtctagctc	cctggggccc	tccgtcgagg	ccctcctggt
961	ctctccctag	gcccccgga	ctccctgctc	ctggctttcg	ccctgctctg	cctgccttgg
1021	actcagggtg	tgggcgcctt	cccagccatg	tccttgctcg	gacctgttgc	caacgtgtg
1081	ctccgggctc	agcacctgca	tcagctgggt	gctgacacct	tcaaagagtt	tgtaagctcc
1141	cgagggatgc	gtcctagggg	tggggaggca	ggaaggggtg	aatecacacc	ccctccacac
1201	agtgggagga	aactgaggag	ttcagccgta	ttttatccaa	gtagggatgt	ggttagggga
1261	gcagaaacgg	gggtgtgtgg	gggtgggagg	gttccgaata	aggcggggag	gggaaccgcg
1321	caccagctta	gacctgggtg	gggtgtgtct	tccccagga	gcgcacctac	atcccggagg
1381	gacagagata	ctccatccag	aacaccaggg	ttgccttctg	cttctctgaa	accatcccgg
1441	ccccacggg	caagaatgag	gcccagcaga	aatcagttag	tggcaacctc	ggaccgagga
1501	gcaggggacc	tccttcaccc	taagttaggt	gccccagctc	ccgcaccggc	ctggggcggc
1561	cttctccccg	agggtggcga	gggtgttgga	tggcagtggg	ggatgatggt	gggcggtggt
1621	ggcaggaggt	cctcgggcag	aggccgacct	tgcagggtcg	ccccagacct	gcggcaccca
1681	ccgaccaccc	acctgccagc	aggacttgga	gctgcttcgc	atctcactgc	tcctcatcca
1741	gtcgtggcct	gggcccctgc	agttcctcag	cagagtcttc	accaacagct	tgggtgtttg
1801	cacctcggac	cgtgtctatg	agaagctgaa	ggacctggag	gaaggcatcc	tggccctgat
1861	gcgggtgggg	atggcgttgt	gggtcccttc	catgtggggg	ccatgccgcg	ccctctcctg
1921	cttagccagg	agaatgcacg	tgggcttggg	gagacagatc	cctgctctct	ccctctttct
1981	agcagtcag	ccttgaccca	ggggaaacct	tttccccttt	tgaacctctc	ttctctgccc
2041	ttctccaagc	ctgtaggggg	gggtggaaaa	tggagcgggc	aggagggaag	tgctcctgag
2101	ggcccttcgg	cctctctgtc	tctccctccc	ttggcaggag	ctggaagatg	gcaccccccg
2161	ggctgggcag	atcctcaagc	agacctatga	caaatttgac	acaaacatgc	gcagtgcaga
2221	cgcgctgctc	aagaactacg	gtctgtcttc	ctgcttcggg	aaggacctgc	ataagacgga
2281	gacgtacctg	agggtcatga	agtgcgcgcg	cttcggggag	gccagctgtg	ccttctagtt
2341	gccagccatc	tgttgtttgc	ccctcccccg	tgccttcctt	gaccttgga	ggtgccactc
2401	ccactgtcct	ttcctaataa	aatgaggaaa	ttgcatcgca	ttgtctgagt	agggtgcatt
2461	ctattctggg	gggtgggggtg	gggcaggaca	gcaaggggga	ggattgggaa	gacaatagca
2521	ggcatgctgg	ggatgcgggtg	ggctctatgg	gtaccagagt	gctgaagaat	tgaccgggtt
2581	cctcctgggc	gagaaagaag	caggcacatc	cccttctctg	tgacacaccc	tgctccagcc
2641	cctgggttct	agttccagcc	ccactcatag	gacactcata	gctcaggagg	gctccgctt
2701	caatcccacc	cgctaaagta	cttgagcgcg	tctctccctc	cctcatcagg	ccaccaaacc
2761	aaacctagcc	tccaagagtg	ggaagaaatt	aaagcaagat	aggctattaa	gtgcagaggg
2821	agagaaaatg	cctccaacat	gtgagggaat	aatgag		

Gambar 2. Sekuens gen hormon pertumbuhan (bGH) pada sapi *Bos Taurus* dari Gen Bank nomor akses M57764.1 (Gordon, *et al*, 1983)

meningkatkan ketepatan dan efesiensi seleksi dengan menerapkan penanda genetik melalui *marker-assisted selection* (MAS), sehingga polimorfisme genetik (*marker loci*) yang berhubungan dengan sifat tertentu yang diinginkan adalah sangat berguna (Zhao *et al.*, 2004).

Gen bGH diketahui memiliki keragaman yang tinggi (Cowan *et al.*, 1989). Sedangkan Ferraz *et al.*, (2006) mendapatkan adanya variasi pada posisi 160, 161 dimana GT diganti dengan CTG, adanya delesi pada posisi 191 dan 193, dan pergantian T menjadi C pada posisi 247 dan 297 jika dibandingkan dengan sekuen bGH1 Gordon *et al.* (1983).

Tempat polimorfisme untuk enzim pemotong *MspI* terletak pada intron 3 dengan posisi 1547 (Zhang *et al.*, 1992 dan 1993). Sedangkan Lucy *et al.* (1991) mendapatkan dua bentuk polimorfisme pada exon ke-5 dengan enzim pemotong *AluI* yaitu terdapatnya substitusi *citosine (C)* menjadi *guanine (G)* yang menyebabkan perubahan asam amino dari *leucine (L, kodon CTG)* menjadi *valine (V, kodon GTG)* pada residu 127. Unanian *et al.* (1994) dengan teknik PCR-RFLP juga menemukan adanya polimorfisme gen bGH dengan menggunakan enzim pemotong *HaeIII* yang terletak pada exon ke-5 dan daerah pengapitnya. Selanjutnya Zakizadeh *et al.*, (2006) mendapatkan polimorfisme fragmen bGH pada intron 3 dan exon 5 dengan menggunakan enzim pemotong *MspI*, *AluI* dan *DdeI*. Keragaman gen bGH ini ditunjukkan dengan adanya polimorfisme pada situs-situs tertentu mungkin saja terkait erat dengan ekspresi gen ini pada pola pertumbuhan bangsa-bangsa sapi yang ada (Unanian *et al.*, 2000; Ge *et al.*, 2001; Reis *et al.*, 2001; Sorensen *et al.*, 2002; Dybus, 2002; Zwierzchowski *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002; Oprzadek *et al.*, 2003; Rahmani, 2003; Tambasco *et al.*, 2003; Marshall and Kim, 2003).

2.4. Hubungan Keragaman Gen Hormon Pertumbuhan dengan Sifat Produksi.

Keterkaitan polimorfisme gen bGH dengan sifat-sifat produksi pada beberapa hewan selain sapi secara intensif telah dipelajari pada berbagai jenis ternak

seperti pada ayam (Kuhnlein *et al.*, 1997) dan babi (Kaminski and Wachik, 2002; Pierzchala *et al.*, 2004). Selain adanya keterkaitan polimorfisme gen bGH dengan sifat produksi, gen bGH juga dimanfaatkan untuk mempelajari keragaman genetik dan struktur populasi (Liron *et al.*, 2002), jarak genetik (Kemenes *et al.*, 1999) dan seleksi untuk bangsa spesifik (Regitano *et al.*, 1999).

Adanya polimorfisme tersebut dideteksi menggunakan penciri (*marker*) DNA (*Dioxyribose Nucleic Acid*) seperti *Restriction Fragment Length Polymorphism* DNA (Botstein *et al.*, 1980) dan dikombinasikan dengan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Lucy *et al.*, 1991; Zhang *et al.*, 1993; Unanian *et al.*, 2000; Sri Rahayu *et al.*, 2006) serta perunutan DNA secara cepat (Woychick *et al.*, 1982; Smith *et al.*, 1986). Unanian *et al.* (1994) menemukan adanya 3 variasi di dalam gen GH sapi dengan munculnya fragment 268 bp, 102 bp, 71 bp dan 50 bp. Dybus *et al.* (2002) dengan menggunakan enzim restriksi *AluI* menemukan adanya hubungan antara polimorfisme gen GH dengan produksi susu pada sapi *black-white* polandia dan mendapatkan adanya polimorfisme bGH/*AluI*-*MspI*. Pada *Japanese black cattle* bGH memiliki 3 haplotip A, B, C (Tatsuda *et al.*, 2008) dan adanya mutasi pada posisi 127 dan 172 exon 5 (leucine₁₂₇, threonine₁₇₂), (valine₁₂₇, threonine₁₇₂) and (valine₁₂₇, methionine₁₇₂). Selanjutnya Tatsuda *et al.* (2008) melaporkan berat karkas dan pelemakan rendah berhubungan dengan haplotip A, dan pelemakan daging akan ditingkatkan oleh haplotip C.

Reis *et al.* (2001) melaporkan adanya hubungan polimorfisme bGH-*AluI* dengan pertumbuhan dan berat badan pada sapi Portugis. Polimorfisme bGH intron III pada Indian Zebu (*Bos Indicus*) dengan enzim *MspI* telah diteliti oleh

Sodhi *et al.* (2007) yang memperoleh dua alel (*MspI*⁻ and *MspI*⁺). Sedangkan Ferraz (2006) mendapatkan 6 polimorfisme baru pada fragmen gen bGH yaitu satu indel dan lima SNP yang bisa digunakan sebagai marker genetik. Telah diketahui bGH memegang peran penting pada proses biologis seperti perkembangan kelenjar susu, laktasi, pertumbuhan dan pengaturan metabolisme (Etherton and Bauman, 1998), sehingga merupakan kandidat gen marker untuk peningkatan produksi susu dan daging. Telah banyak penelitian mengenai hubungan antara polismorfis pada *locus* bGH dengan sifat produksi seperti persentase protein susu (Lagziel *et al.*, 1996; Vukasinovic *et al.*, 1999). Polimorfisme pada exon 5 berhubungan dengan dua bentuk hormon dilaporkan oleh Lucy *et al.* (1991).

Berdasarkan sekuen bGH Gordon *et al.* (1983) terdapat substitusi guanine (G) oleh cytosine (C) pada posisi 2141 (Zhang *et al.*, 1992) yang menyebabkan terjadinya perubahan asam amino leucine (L, codon CTG) menjadi valine (V, codon GTG) pada residue 127. Perubahan ini bisa terdeteksi dengan enzim *AluI* karena enzim tidak mengenal sekuen G dibanding C. Polimorfisme bGH *AluI* (+/-) dipercaya berhubungan dengan konsentrasi GH plasma, dimana genotip LL bisaanya berhubungan dengan tingginya sirkulasi GH jika dibandingkan dengan genotip LV (Schlee *et al.*, (1994). Chrenek *et al.* (1998) melaporkan adanya hubungan antara polimorfisme bGH-*AluI* dengan sifat produksi daging pada sapi Slovak Simmental. Barendse *et al.* (2006) mendapatkan fragmen GH1:c.457C alel berhubungan dengan pelemakan rendah.

Penemuan tersebut akan memberikan hasil dan harapan baru dalam upaya perbaikan mutu genetik ternak (Soller and Beckmann, 1983) termasuk ternak-ternak

lokal kita seperti Sapi Pesisir dengan keunikannya yang khas. Apabila penciri-penciri tersebut (PCR-RFLP bGH) menunjukkan keterkaitan dengan sifat-sifat produksi yang menguntungkan terutama sifat-sifat yang ekonomis, maka penciri tersebut dapat digunakan sebagai salah satu kriteria seleksi atau yang lebih populer dikenal dengan MAS (*Marker Assisted Selection*) atau GAS (*Genotype Assisted Selection*) (Chung *et al.*, 1998).

Melalui MAS dimungkinkannya suatu peningkatan mutu genetik yang lebih berarti yaitu 15-30% (Kashi *et al.*, 1990) dan bahkan diharapkan sampai 44,7-99,5% tergantung kepada model yang digunakan. Namun demikian, penerapan dengan menggunakan pendekatan MAS memerlukan suatu indentifikasi penciri gen kandidat (*candidate gene*). Menurut Park (2004), gen kandidat adalah gen-gen yang sebelumnya telah diidentifikasi dan diketahui fungsi biokimianya dan alur fisiologi dari sifat yang diinginkan.

Gen hormon pertumbuhan pada sapi pedaging merupakan salah satu gen kandidat yang berhubungan dengan bobot hidup (Reis *et al.*, 2001), penambahan bobot badan (Tambasco *et al.*, 2003) yang mengkode dan menghasilkan hormon pertumbuhan untuk mengatur pertumbuhan dan perkembangan sel ternak (Pierzchala *et al.*, 2004). Selain itu gen hormon pertumbuhan berperan sebagai pengatur utama pertumbuhan setelah lahir dan proses metabolisme yang dapat mempengaruhi laju pertumbuhan, komposisi tubuh, kesehatan, produksi susu dan penuaan melalui penyesuaian dengan gen-gen lain (Ge *et al.*, 2003).

2.5. Penanda Molekuler

Program pemuliaan ternak yang menggunakan metoda analisis morfologi berdasarkan observasi fenotif didukung oleh statistika yang rumit dalam populasi.

Selain itu metode ini terkesan sulit karena kerumitan genetika dari sebagian besar sifat-sifat produksi dan adanya interaksi yang kuat dengan faktor lingkungan. Karena itu karakterisasi morfologi perlu didukung oleh karakterisasi yang dilakukan melalui penanda molekuler. Penanda molekuler dapat memberi gambaran hubungan kekerabatan yang akurat antar spesies maupun kerabat jauhnya, karena analisis DNA sebagai material genetik tidak dipengaruhi oleh faktor lingkungan (Lefebvre *et al.*, 2001)

Perkembangan ilmu pengetahuan khususnya bioteknologi yang disebut *molecular marker* berdasarkan polimorfisme yang terdapat pada protein atau DNA, telah secara luas memfasilitasi penelitian dalam disiplin ilmu seperti ekologi, genetika dan pemuliaan (Weising *et al.*, 1995). Data informasi yang diperoleh dengan teknik-teknik konvensional tetap dan pasti sangat berguna namun harus disadari bahwa saat ini informasi dan data molekuler sangat dibutuhkan oleh pengguna khususnya para pemulia ternak. Karakterisasi yang menghasilkan data keragaman genetik berdasarkan marka-marka molekuler seperti RAPD, RFLP, dan SSR (mikrosatelit), pemetaan gen maupun sidik jari DNA dapat dimanfaatkan sebagai modal dasar dalam perakitan kultivar baru (Jamsari, 2008).

Peterson *et al.* (1991) menyatakan bahwa teknologi molekuler menjanjikan ketepatan dan akurasi, serta ketelitian metode analisis yang baik, karena peran marka DNA yang paling mendasar adalah mendeteksi variasi atau perbedaan antar beberapa individu. Selain itu analisis DNA juga berguna dalam penentuan gen yang berperan penting dalam sifat tertentu dan hubungan kekerabatan (Lefebvre *et al.*, 2001) karena analisis DNA sebagai material genetik tidak dipengaruhi oleh faktor lingkungan. Marka DNA lebih banyak digunakan dalam menyusun sifat genetik suatu organisme

yang berguna untuk menetapkan lokasi kromosom (lokus) dari gen yang mengatur sifat tertentu, baik sifat sederhana (kualitatif) maupun kompleks (kualitatif). Marka DNA lebih banyak tersedia dibandingkan dengan marka lainnya, sehingga memudahkan untuk menyusun peta genetik yang lebih sempurna (Nasir 2000).

DNA adalah polimer asam nukleat yang tersusun secara sistematis dan merupakan pembawa informasi genetik yang diwariskan pada turunannya. Informasi disusun dalam bentuk kodon berupa tiga pasang basa nukleotida dan menentukan bentuk, struktur, dan fisiologi suatu makhluk hidup (Yuwono, 2006).

Dalam konteks MAS, marka berbasis DNA dapat lebih efektif jika digunakan untuk tiga tujuan dasar yaitu: 1) identifikasi galur-galur tetua untuk perbaikan suatu karakter untuk tujuan khusus, 2) penelusuran alel-allel dominan atau resesif pada setiap generasi persilangan, dan 3) identifikasi individu-individu target sesuai dengan karakter yang diinginkan di antara turunan yang bersegregasi, berdasarkan komposisi alel persilangan sebagian atau seluruh genom (Azra'i, 2006). Selain untuk mempelajari adanya variasi genetik, keperluan khusus sistem penanda sebagai alat deteksi kehadiran alel-allel spesifik yang mencirikan karakter-karakter penting tertentu dari suatu organisme merupakan kontribusi lainnya yang ditunjukkan oleh penanda molekuler (Jamsari dan Ferita, 2010).

2.6. Polimorfisme Nucleotida Tunggal (SNP)

Single nucleotide polymorphism (SNP) pertama kali ditemukan oleh Wang *et al.* (1998). SNP adalah variasi dari sekuens DNA yang terjadi jika suatu nukleotida tunggal A, T, C, atau G genom berbeda antara suatu individu dengan individu lainnya. Sebagai contoh, ada dua sekuens fragmen DNA dari dua individu: CCTGGA dan CTTGGA, terdapat perbedaan pada satu basa

nukleotidanya sehingga terdapat dua alel yaitu alel C dan T dan biasanya SNP hanya memiliki dua alel (Rapley dan Harbron (2004) dalam Sari, 2011).

Menurut Jamsari (2007) kekuatan teknik prinsip SNP sangat tergantung pada ketersediaan informasi sekuens, dan tidak dapat digantikan dengan informasi lain. Metoda yang didasarkan SNP sangat mudah di automasi (*no electrophoresis, easy allele calling*), dan akan menjadi lebih efektif dari segi biaya dibanding *microsatellites* (Peralta *et al.*, 2005).

Penelitian genom skala luas sudah menjadi hal biasa saat ini. Pada manusia penelitian hubungan genetik didasarkan kepada membandingkan genetik marker, yang sering dipakai adalah *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP), antara group yang sakit dengan yang sehat (*case-control study*). Jika terdapat perbedaan yang nyata secara statistik antara frekuensi allele SNP antara kedua kelompok pasien, itu berarti gen terlibat dalam perkembangan penyakit (Coulounges *et al.*, 2006). Dengan banyaknya ditemukan SNP sepanjang genom dan makin mudahnya proses genotyping menyebabkan marker ini semakin luas dipakai pada penelitian gen kandidat (Cousin *et al.*, 2006). Pada penelitian struktur populasi, *microsatellite* lebih informatif dibanding SNP, akan tetapi jika SNP yang tersedia sangat banyak penggunaanya sangat menjanjikan (Liu *et al.*, 2005).

Secara tradisional analisis tautan untuk mengidentifikasi daerah genom yang berhubungan dengan suatu penotip, biasanya dilakukan dengan menggunakan 300 - 400 *microsatellite* dan untuk memaksimumkan peluang adanya tautan, adanya sejumlah informasi famili sangat diperlukan. Hal ini bisa ditingkatkan dengan menambah famili dan marker yang digunakan. Dengan makin banyaknya

penemuan SNP sepanjang genom dan makin berkembangnya proses *genotyping* penggunaan SNP akan menjadi lebih *powerful* dan lebih murah dibanding marker microsatellite pada analisa tautan (Kennedy *et al.*, 2003). Pada penelitian simulasi dan penelitian di lapangan menunjukkan penggunaan SNP densitas tinggi mempunyai beberapa keuntungan dibanding penggunaan *microsatellite* densitas rendah, termasuk meningkatkan *power* dalam mendeteksi adanya tautan (Evans, 2004; Middleton *et al.*, 2004) dan pemetaan yang lebih tepat suatu penotip penyakit pada suatu lokus (John *et al.*, 2004).

Secara rata-rata marker microsatellite lebih baik dibanding SNP dalam analisa tautan. Jika penotip tetua tidak ada SNP sedikit lebih baik dari microsatellite (Yue *et al.*, 2005). Dibanding dengan microsatellites, SNP lebih berlimpah dan terdistribusi secara menyeluruh sepanjang genom dan lebih dipercaya dan hanya membutuhkan sejumlah kecil sampel, dan dengan menggunakan SNP analisis tautan berdasarkan genome secara luas bisa dilakukan dengan biaya lebih rendah (Matise *et al.*, 2003; Xing *et al.*, 2005). Penggunaan *single-nucleotide polymorphism* (SNP) pada analisis tautan adalah suatu strategi yang relatif baru, dan penggunaannya akan memberikan hasil yang lebih baik jika dikombinasikan dengan marker yang berdekatan (analisis multi point) (Ulgen and Li, 2005). Dengan tersedianya peta yang padat dan posisi peta yang akurat dan *genotyping* biaya rendah SNP akan segera menjadi sangat berguna pada analisis tautan dan studi hubungan (Lin and Liu, 2005)

Mutasi DNA terdiri atas mutasi transisi dan mutasi transversasi. Mutasi transisi adalah suatu pergantian basa purin dengan basa purin lain atau pergantian basa pirimidin dengan basa pirimidin lain; atau disebut juga pergantian suatu

pasangan basa purin-pirimidin dengan pasangan purin-pirimidin lain sedangkan mutasi tranversi, yaitu suatu pergantian antara purin dengan pirimidin pada posisi yang sama. Disamping mutasi perobahan sekuen DNA ada juga yang disebut insersi, yaitu penambahan satu atau lebih pasangan nukleotida pada suatu gen dan delesi, yaitu pengurangan satu atau lebih pasangan nukleotida pada suatu gen. (Schleif, 1993)



III. BAHAN DAN METODE

Data penelitian ini berasal dari data penelitian lapangan dan penelitian laboratorium. Penelitian lapangan untuk mendapatkan sampel darah dan memperoleh data berat badan dan penelitian laboratorium untuk memperoleh data polimorfisme dan sekuen gen hormon pertumbuhan. Untuk jelasnya *flowchart* penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.

3.1. Penelitian Lapangan

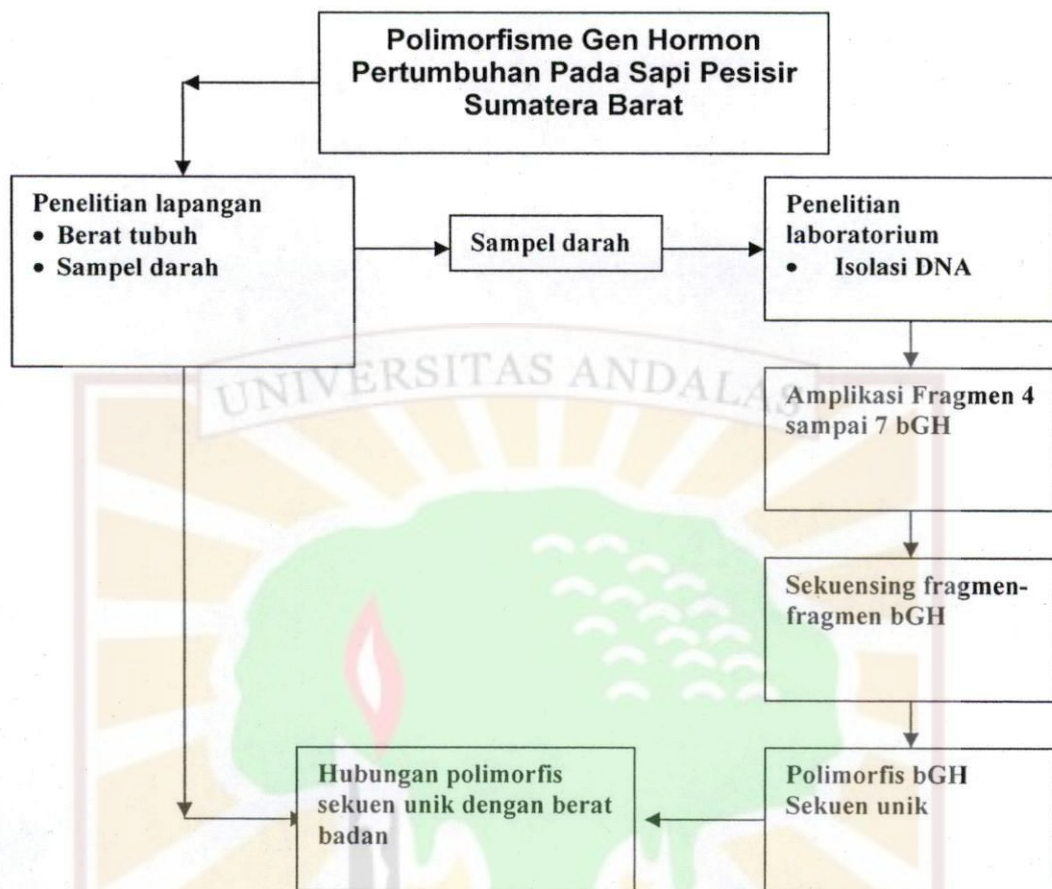
3.1.1. Tempat dan Waktu

Penelitian ini merupakan penelitian lapangan untuk mendapatkan data bobot badan serta sampel darah Sapi Pesisir yang dilaksanakan di Kabupaten Pesisir Selatan yaitu pada Kecamatan Ranah Pesisir, Kecamatan Kambang dan Kecamatan Sari Linggo Baganti. Daerah ini dipilih karena pada daerah ini populasi ternak sapi belum banyak tercemar oleh bangsa-bangsa sapi lain baik melalui pejantan hidup maupun melalui inseminasi buatan jika dibandingkan dengan daerah lainnya.

Penelitian lapangan ini dilakukan sekitar tiga bulan mulai bulan April sampai dengan Juni 2009.

3.1.2. Bahan dan Alat

Penelitian ini dilakukan pada sampel ternak Sapi Pesisir milik masyarakat di Kecamatan Ranah Pesisir Kabupaten Pesisir Selatan Sumatera Barat yang dipelihara secara semi intensif. Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari timbangan ternak digital kapasitas 400 kg dengan ketepatan sampai



Gambar 3. *Flowchart* penelitian

0,5 kg, pita ukur (108 inci) dengan skala 0.5 inci produksi The Coburn Co., Inc. Whitewater, Wisconsin, tongkat ukur satuan cm dengan skala 0.1 cm, dan alat-alat tulis.

3.1.3. Metode Penelitian

3.1.3.1. Penarikan Sampel Ternak Sapi

Penarikan sampel ternak sapi dilakukan dengan cara penarikan otoritas (Steel dan Torrie, 1995) dengan kriteria: bangsa sapi adalah Sapi Pesisir yang hidup di Kecamatan Ranah Pesisir, Kecamatan Lengayang, dan Kecamatan Linggo Sari Baganti, Kabupaten Pesisir Selatan dengan ciri-ciri mempunyai warna bulu salah satu dari 4 kelompok warna utama yaitu yaitu merah bata, kuning, hitam, dan putih (Sarbaini, 2004). Ciri lainnya berpunuk kecil sampai sedang, tanduk pendek dan mengarah keluar, seperti tanduk kambing (Saladin, 1983).

Kecamatan Ranah Pesisir dipilih karena Sapi Pesisir di kecamatan ini dianggap belum tercemar dibanding daerah lainnya, dan kedua kecamatan lain dipilih karena bertetangga dengan kecamatan Ranah Pesisir. Sampel ternak adalah sapi yang dipilih berumur $\pm 1,5$ tahun dengan kelamin jantan. Penentuan umur ternak sapi sampel dilakukan berdasarkan pada keterangan langsung dari peternak dan pertukaran gigi seri menurut klassifikasi I_1 mulai berganti. Jumlah sampel ternak sapi adalah 210 ekor yaitu 70 ekor pada masing-masing kecamatan, yang nantinya akan dihitung rata-rata bobot badan dan standar deviasinya. Dari 210 ekor sampel akan dipilih 60 ekor sapi dengan ketentuan 30 ekor dengan berat badan paling rendah dan 30 ekor dengan berat badan paling tinggi, kemudian sampel darah 60 ekor ternak terpilih diambil.

3.1.3.2. Peubah dan Metode Pengukuran

Peubah yang diamati dan diukur pada penelitian ini adalah karakter kuantitatif (a) bobot badan, (b) umur. Bobot badan (kg), diperoleh dengan

menimbang ternak sapi sampel menggunakan timbangan teknis khusus untuk ternak sapi, dilakukan pada pagi – siang hari.

3.2. Penelitian Laboratorium

Penelitian di laboratorium dilakukan untuk menganalisis variasi sekuen fragmen-fragmen gen hormon pertumbuhan dan pendisainan primer terpaut penotipik bobot badan tinggi.

3.2.1. Analisis Variasi Sekuen

3.2.1.1. Tempat dan Waktu

Penelitian laboratorium untuk isolasi DNA dilakukan di Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman, Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Andalas. Amplifikasi fragmen bGH dilakukan di Laboratorium Bioteknologi dan Pemuliaan Tanaman, Jurusan Budidaya Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Andalas dan Departemen Genetika Universitas Kassel Jerman. Sekuensing dilakukan di PT Charoen Pokphand Indonesia, Lembaga Biomolecular Eijkman, dan SeqLab Laboratories Gottingen Jerman.

3.2.1.2. Bahan dan Metoda

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian laboratorium antara lain adalah 60 sampel darah Sapi Pesisir Sumatera Barat, pereaksi isolasi DNA, pereaksi PCR, primer, gel purifikasi.

3.2.1.3. Peubah dan Metoda Analisis Variasi Sekuen.

3.2.1.3.1. Peubah.

Peubah yang diamati terkait dengan analisis DNA pada fragmen GH yaitu (a) sekuen fragmen GH4, GH5, GH6, dan GH7 yang meliputi daerah intron 3

sampai daerah ujung gen GH, (b) jumlah dan variasi sekuen fragmen GH4, GH5, GH6, dan GH7.

3.2.3.2. Metoda Analisis Variasi Sekuen

Dalam analisis variasi sekuen ada empat kegiatan yang dilakukan yaitu (a) isolasi DNA total, (b) amplikasi fragmen-fragmen bGH, (c) gel purifikasi dan, (d) sekuensing.

a. Isolasi DNA Total

Isolasi DNA genomik dari darah sapi dilakukan dengan menggunakan protokol Genomic DNA Purification Kit dari Promega. Dengan prosedur sebagai berikut: 300 μ l sampel darah ditambahkan 900 μ l larutan *sel lysis* dalam tabung sentrifus ukuran 1,5 ml. Dicampur sampai rata dengan cara membolok-balik tabung sebanyak 5-6 kali dan diinkubasi pada suhu kamar selama 10 menit selama masa inkubasi tabung di bolak-balik 2-3 kali agar sel terlisis dengan baik. Kemudian di sentrifugasi dengan kecepatan 15000 g selama 20 detik, supernatannya dibuang dan pellet yang tinggal di vortex sampai tercampur rata. Selanjutnya ditambahkan 300 μ l larutan *nuclei lysis* dan cairan dipipet *up-down* sehingga pellet mencair atau larut sampai larutan bersifat viscous. Setelah itu diinkubasi dengan suhu 37°C selama 1 jam, kemudian ditambahkan larutan pengendap protein (*Protein Precipitation*) sebanyak 200 μ l, sehingga terbentuk endapan keruh. Disentrifugasi dengan kecepatan 15000 g selama 3 menit dan supernatannya ditransfer ke tabung sentrifus baru yang steril (ukuran 1,5 ml) dan dipresipitasi dengan isopropanol suhu ruang sehingga terlihat benang-benang DNA. Untuk mengendapkan DNA pellet disentrifugasi dengan kecepatan 15000 g selama 1 menit dan supernatannya dibuang dengan hati-hati. Pellet yang dihasilkan dicuci dengan ethanol 70% kemudian disentrifugasi lagi

dengan kecepatan 15000 selama 30 detik, selanjutnya ethanol dibuang sampai habis dan dikeringanginkan pada suhu ruang selama 10-15 menit. Setelah kering ditambahkan larutan rehidrasi sebanyak 50-100 µl tergantung kepada ukuran pellet yang diperoleh selanjutnya dielektroforesis untuk melihat konsentrasi DNA yang diperoleh. DNA yang diperoleh disimpan pada suhu (-20°C) sampai siap digunakan.

b. Amplifikasi Fragmen Gen Hormon Pertumbuhan

Setelah DNA diisolasi selanjutnya diampifikasi menggunakan empat pasang primer yang diharapkan mampu mengamplifikasi gen hormon pertumbuhan. Primer tersebut disajikan pada Tabel 1.

Prosedur amplikasi PCR menggunakan ready To Go PCR (RTG-PCR dari GE-Healthcare-UK) dengan komposisi sebagai berikut : 25 µl campuran reaksi yang terdiri dari 4 µl masing-masing primer (pasangan primer), 2 µl DNA genom, dan 19 µl ddH₂O dimasukkan kedalam tabung RTG-PCR. Amplikasi

Tabel 1. Sekuen dan posisi oligonukleotida yang digunakan untuk PCR Gen GH pada Sapi Pesisir.

Fragmen	Primer	Sekuen Primer	Lokasi	Panjang (bp)
GH4	P1	5'-GGACAGAGATACTCCATCCAG-3'	1380/1724	345
	P2	5'-AGATGCGAAGCAGCTCCAAGT-3'		
GH5	P3	5'-TTGGAGCTGCTTCGCATCTCA-3'	1706/2071	366
	P4	5'-ATTTTCCACCCTCCCCTACAG3'		
GH6	P5	5'-TAGGGGAGGGTGGAAAATGGA-3'	2054/2457	404
	P6	5'-GACACCTACTCAGACAATGC-3'		
GH7	P7	5'-CACTCCCACTGTCCTTTCCTA-3'	2396/2850	455
	P8	5'-ACTTCCTCACATGTTGGAGGC-3'		

Sumber Yao *et al* (1996)

dilakukan dengan denaturasi awal 94°C selama 2 menit, amplikasi dijalankan 40 siklus yang terdiri dari 94°C selama 30 detik, 62°C selama 80 detik, dan 72°C selama 90 detik, diikuti dengan 5 menit pada suhu 72°C. Untuk melihat hasil

amplifikasi dilakukan elektroforesis dengan agarose 1%, yang diwarnai dengan Ethidium Bromide. Pada gel akan terlihat pita-pita yang terbentuk pada setiap alur sumur yang berisi sampel DNA produk PCR. Penentuan ukuran setiap fragmen GH yang terbentuk pada gel agarose dilakukan dengan membandingkan posisi pita yang terbentuk dengan posisi pita DNA *ladder*. DNA yang terekpresi didokumentasi dengan kamera UV.

c. Gel Purifikasi

Jika fragmen hasil amplifikasi PCR tidak spesifik, gel yang berisikan fragmen target diisolasi dari gel agarose dengan teknik pemotongan yang dilakukan secara hati-hati karena harus dilakukan dibawah sinar UV. Pemotongan dengan menggunakan *scalpel* steril dengan cara mengambil bagian yang mengandung fragmen yang dikehendaki. Fragmen tersebut dimasukkan kedalam tabung eppendorf 1,5 ml steril, dielusi dan selanjutnya dipurifikasi menggunakan Nucleo Spin Purifikasi Kit. Potongan fragmen tersebut diencerkan dengan *membrane binding solution* (larutan pengikat membrane) dengan perbandingan 10 µl setiap 10 mg berat agar yang dipotong, campuran tersebut ditipping kemudian divortex hingga melarut dengan sempurna. Selanjutnya campuran diinkubasi dalam *waterbath* dengan suhu 65°C selama 5 – 10 menit, larutan dipipet dan dimasukkan kedalam minikolum, kemudian disentrifuse dengan kecepatan 14000 rpm selama 1 menit. Minikolum dicuci dengan menambahkan larutan 700 µl *membrane wash solution* dan selanjutnya disentrifuse dengan kecepatan 14000 rpm selama 1 menit. Fasa air dibuang kemudian dicuci lagi dengan menambahkan 500 µl *membrane wash solution* dan disentrifuse dengan kecepatan 14000 rpm selama 1 menit dan fasa cair dibuang.

Minikolum dipindahkan kedalam ependorf 1,5 ml yang baru yang dibuang tutupnya, selanjutnya ditambahkan 50 μ l *Nuclease free water* dan diinkubasi selama 1 menit pada suhu ruang, Selanjutnya disentrifus lagi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit. Produk purifikasi disimpan pada suhu 4°C atau -20°C dan siap untuk sekuensing. Jika produknya kurang bagus, maka dilakukan amplifikasi ulang sampai konsentrasi fragmen targetnya cukup besar.

d. Sekuensing

Produk PCR hasil amplifikasi digunakan untuk sekuensing nukleotida, menggunakan metode Sanger *et al.* (1977) dengan prosedur yang disarankan oleh Sambrook and Russel (2001). Hasil analisis pada layar monitor akan menunjukkan grafik dengan puncak-puncak (*peak*) dalam ukuran *base pairs* (bp) pada masing-masing sampel. Tampilan grafik yang konsisten membentuk satu ukuran puncak yang sama menunjukkan bahwa sampel teramplifikasi dan memiliki alel yang homozigot. Sementara sampel yang memiliki dua puncak dengan ukuran berbeda menunjukkan dua alel yang heterozigot. Apabila terdapat tampilan grafik yang tidak beraturan, ini menandakan hasil yang kosong atau tidak bisa dinilai. Apabila diperoleh tanda sinyal yang lebih dari dua grafik, maka sampel tersebut tercemar dengan DNA yang lain dan tidak digunakan (Sari, 2011).

Hasil sekuen yang diperoleh dilihat keragamannya dan diuji kesamaannya antar jenis sapi maupun dengan bangsa sapi lain yang ada di *Gen Bank* menggunakan program dengan menggunakan program DNA Star. Dengan menggunakan sekuen Gordon *et al.*, (1983) sebagai dasar analisis akan didapatkan

kesamaan sekuen, juga akan teridentifikasi secara pasti posisi ada tidaknya mutasi atau terjadinya indel pada gen hormon pertumbuhan pada Sapi Pesisir.

3.3. Analisis Data

Analisis statistik deskriptif untuk memperoleh karakterisasi bobot tubuh Sapi Pesisir dilakukan dengan menghitung rata-rata (\bar{x}), simpangan baku (s), dan koefisien keragaman (KK) dengan prosedur berikut (Steel *et al.* 1997)

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

$$s = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}}{n-1}, \text{ dan}$$

$$KK(\%) = \frac{s}{\bar{x}} (100\%)$$

Dimana x_i adalah ukuran ke i peubah X , n jumlah sampel

Analisis deskriptif untuk melihat keragaman sekuen bGH dilakukan menurut prosedur SNPtat (Sole *et al.*, 2006) sebagai berikut.

3.3.1. Frekuensi Genotipe

Frekuensi genotipe dihitung berdasarkan jumlah alel suatu genotipe dibagi dengan jumlah sampel :

$$F_i = \frac{\sum x_i}{N} ; x_i = \text{genotipe yang diamati}$$

Frekuensi alel dihitung dengan menjumlah semua alel dibagi dengan $2N$

$$F_2 = \frac{\sum x_i}{2N} ; x_i = \text{alel yang diamati}$$

3.3.2. Uji χ^2 (Chi-Square)

Untuk menguji apakah ada hubungan antara SNP dengan dengan berat badan dibuat tabel kontingensi antara keduanya kemudian diuji dengan uji χ^2 ;

$$\chi^2 = \sum \sum \frac{(O_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}}$$

Keterangan :

χ^2 = Uji Chi-Square

O_{ij} = jumlah pengamatan genotip ke i kelompok berat badan ke j

E_{ij} = jumlah harapan genotip ke i kelompok berat badan ke j



IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Tinjauan Daerah Penelitian

Kabupaten Pesisir Selatan merupakan salah satu dari 19 kabupaten / kota di Propinsi Sumatra Barat. Wilayahnya meliputi daratan bagian selatan Pulau Sumatera dan wilayah kepulauan dengan luas wilayah 5.749,89 Km² yang membentang dari Utara ke Selatan dengan panjang garis pantai 234 Km. terletak pada posisi 0° 59° Lintang Selatan sampai dengan 2° 28,6° Lintang Selatan dan 100° 19° Bujur Timur sampai dengan 101° 18° Bujur Timur. Kabupaten Pesisir Selatan, sebelah Utara berbatasan dengan Kota Padang, sebelah Timur dengan Kabupaten Solok, Kabupaten Solok Selatan dan Propinsi Jambi, sebelah Selatan dengan Propinsi Bengkulu dan sebelah Barat dengan Samudera Indonesia. (<http://pessselkab.bps.go.id> dan <http://www.pesisirselatan.go.id>).

Kabupaten Pesisir Selatan memiliki topografi wilayah berbukit-bukit dengan ketinggian berkisar 0-1000 m dari permukaan laut, memiliki 57 buah pulau serta dialiri sebanyak 18 sungai dengan 11 sungai besar dan 7 sungai kecil. Secara umum Kabupaten Pesisir Selatan beriklim tropis dengan temperatur bervariasi antara 23⁰ C hingga 32⁰ C di siang hari dan 20⁰ C - 28⁰ C di malam hari. Kondisi permukaan lahan Kabupaten Pesisir Selatan adalah sebagian besar lahan hutan yaitu 70,54% hutan lebat dan 13,37% hutan belukar, lahan sawah 6,07%, perkebunan 2,30% dan sisanya adalah perkampungan, kebun campuran dan kebun rakyat lainnya (<http://www.pesisirselatan.go.id>). Rata-rata curah hujan selama 5 tahun terakhir adalah 204,27 mm/bulan dan rata-rata hari hujan 11,92 hari/bulan, curah hujan yang baik dan merata ini telah menjadikan sebahagian besar wilayah

Kabupaten Pesisir Selatan sangat berpotensi dalam pengembangan pertanian, peternakan dan perkebunan, khususnya dalam menghasilkan ternak, beras.

Secara administratif Kabupaten Pesisir Selatan dibagi atas 12 Kecamatan yaitu : Kecamatan Koto XI Tarusan, Kecamatan Bayang, Kecamatan Bayang Utara, Kecamatan IV Jurai, Kecamatan Batang Kapas, Kecamatan Sutera, Kecamatan Lengayang, Kecamatan Ranah Pesisir, Kecamatan Linggo Sari Baganti, Kecamatan Pancung Soal, Kecamatan Basa IV Balai dan Kecamatan Lunang Silaut. Kecamatan penelitian adalah Kecamatan Lengayang, Kecamatan Ranah Pesisir, dan Kecamatan Linggo Sari Baganti.

4.2. Rata-rata Berat Badan Sapi Pesisir Umur 1,5 Tahun pada Kedua Kelompok Berat Badan.

Rataan berat badan, standar deviasi dan koefisien keragaman sapi umur 1,5 tahun pada kedua kelompok berat badan (rendah dan tinggi) dan gabungan kedua kelompok berat badan disajikan pada Tabel 4.1. berikut.

Tabel 4.1. Rata-rata bobot badan sapi pada kedua kelompok.

Kelompok Berat Badan	Rata-rata (\bar{x})	Standar deviasi (s)	Koefisien Keragaman (KK)
Kelompok rendah	63,46	6,69	10,54
Kelompok tinggi	131,50	13,00	9,89
Populasi	98,00	23,42	23,90

Dari Tabel 4.1. dapat dilihat rata-rata berat badan Sapi Pesisir umur 1,5 tahun adalah $98 \pm 23,42$ kg dengan koefisien keragaman 23,90%. Sedangkan rata berat sampel terpilih untuk kelompok berat badan rendah adalah $63,46 \pm 6,69$ kg dengan koefisien keragaman 9,89% dan rata-rata berat badan untuk kelompok badan tinggi adalah $131,5 \pm 13$ kg. Dari data berat badan ini terlihat sangat variatif

sekali yang terlihat dari besarnya koefisien keragaman sampel (23,42%) sehingga sangat terbuka peluang untuk melakukan seleksi pada Sapi Pesisir terkait bobot badan. Rataan bobot badan ini tidak jauh berbeda dengan penelitian Sarbaini (2004) yang memperoleh rata-rata bobot sapi anak 84.4 ± 16.0 kg dan bobot badan sapi muda 124.4 ± 23.6 kg, akan tetapi jauh lebih kecil dari penelitian Saladin (1983) melaporkan rata-rata bobot badan Sapi Pesisir jantan dewasa umur 1-2 tahun adalah 190.9 kg. Membandingkan ketiga penelitian ini menunjukkan telah terjadi penurunan bobot badan Sapi Pesisir yang cukup besar dalam 25 tahun terakhir. Penurunan bobot badan sapi lokal juga dialami oleh Sapi Aceh (Abdullah, 2008).

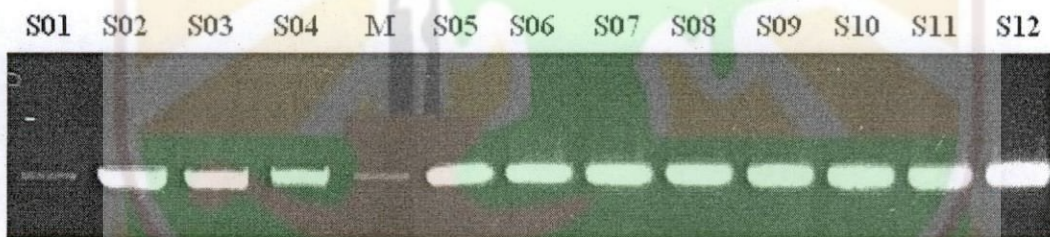
Bobot badan Sapi Pesisir umur 1,5 tahun ini lebih rendah dari bobot badan Sapi Aceh umur 1 tahun yaitu 123,34 kg (Abdullah, 2008) dan jauh lebih rendah dari bobot badan Sapi Bali umur 1 tahun yaitu 140,92 kg (Sukmasari, 2000) yang mengindikasikan bobot badan Sapi Pesisir lebih kecil dari Sapi Aceh dan jauh lebih kecil dari Sapi Bali. Dari data bobot badan ini terlihat Sapi Pesisir mempunyai keragaman bobot badan yang cukup tinggi sehingga berpeluang untuk dilakukan seleksi.

4.3. Isolasi DNA Total

Isolasi DNA genomik dari Darah Sapi dilakukan dengan menggunakan protokol Genomik DNA Purification Kit dari Promega (Promega -USA). Hasil isolasi DNA 60 sampel darah sapi menunjukkan kualitas dan kuantitas DNA yang cukup baik. Kualitas DNA hasil isolasi diestimasi dengan dibandingkan dengan DNA standar (λ DNA 50 ng/ μ l) menggunakan gel elektroforesis, kemudian divisualisasikan dengan UV transiluminator. Salah satu hasil isolasi DNA dari

darah Sapi Pesisir dapat dilihat pada Gambar 4. Hasil dokumentasi tersebut menunjukkan intensitas fragmen yang terbentuk sangat bervariasi. Misalnya sampel S01 mempunyai intensitas sekitar $1 \times \lambda\text{DNA}$, sampel S02 mempunyai intensitas $6 \times \lambda\text{DNA}$, sampel S03 dan S04 $4 \times \lambda\text{DNA}$, sampel S05 dan S06 $6 \times \lambda\text{DNA}$, dan sampel S07, S08, S09, S10, S11, S12 mempunyai intensitas $8 \times \lambda\text{DNA}$.

Gambar 4 juga memperlihatkan bahwa konsentrasi DNA dari darah sapi yang dihasilkan jauh lebih tinggi dari λDNA , yaitu 1 – 8 kali λDNA artinya konsentrasi DNA darah sapi yang diperoleh diperkirakan sekitar 50 – 400 ng/ul. Konsentrasi hasil isolasi DNA yang rendah (50ng/ul) mungkin disebabkan oleh jumlah sampel darah yang digunakan juga sedikit yaitu 100 ul sedangkan sampel lainnya 300 ul.



Keterangan : M = marker 25 ng/ul, S1-S12= sampel individu

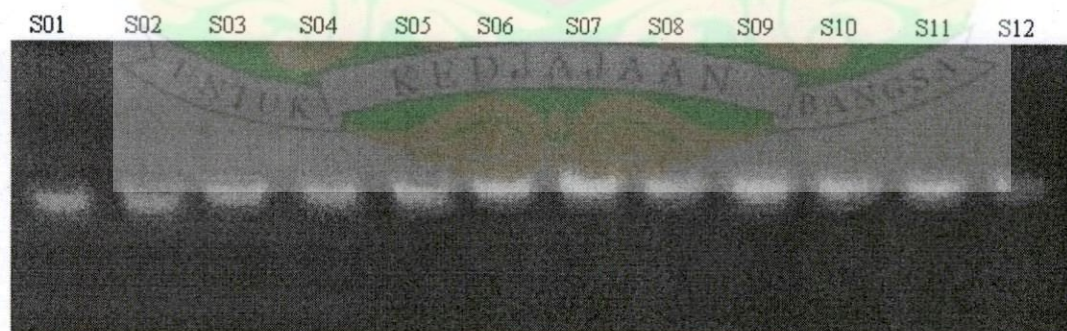
Gambar 4. Elektroforesis DNA total hasil isolasi menggunakan Genomik DNA Purification Kit dari Promega

Semua sampel dapat diisolasi DNA-nya dengan kualitas dan dengan konsentrasi DNA cukup tinggi yaitu antara 50 – 400 ng /ul. Konsentrasi DNA yang dihasilkan sangat tergantung pada lisis inti sel. Jika inti sel dapat dilisis dengan baik maka konsentrasi DNA yang dihasilkan cukup tinggi dan kualitas DNA nya akan bagus. Jika inti sel tidak dilisis dengan sempurna maka DNA yang dihasilkan konsentrasinya sangat rendah dan kadang-kadang masih tercampur dengan bahan

lain. Dengan hasil ini membuktikan Kit Genomik DNA Purification dari Promega cukup handal untuk mengisolasi DNA genomik sapi.

DNA genom yang dihasilkan dapat digunakan untuk kegiatan amplifikasi selanjutnya. Sebelum melakukan amplifikasi langkah yang harus dilakukan adalah pengenceran untuk memperoleh konsentrasi DNA yang sama yaitu 10 ng/μl. Untuk memperoleh DNA genom dengan konsentrasi 10 ng/μl, DNA diencerkan dengan TE 1X atau ddH₂O PCR grade sesuai dengan perhitungan yang dilakukan. Secara lengkap konsentrasi DNA sampel dan konsentrasi yang diinginkan dapat dilihat pada (Lampiran 6). Untuk memastikan konsentrasi DNA yang telah diencerkan telah sama, dilakukan proses elektroforesis dengan agarose 1% pada buffer 0,5 x TBE menggunakan tegangan 100 volt selama 30 menit.

Hasil elektroforesis didokumentasikan dengan menggunakan UV transluminator. Dari hasil elektroforesis (Gambar 5) terlihat konsentrasi DNA telah sama yaitu 10 ng/ul langkah selanjutnya adalah tahap amplifikasi menggunakan mesin PCR dengan menggunakan empat pasang primer GH4, GH5, GH6, GH7. DNA genom hasil pengenceran masing-masing sampel memiliki volume 100 ul. Volume tersebut dirasa cukup untuk kegiatan amplifikasi.

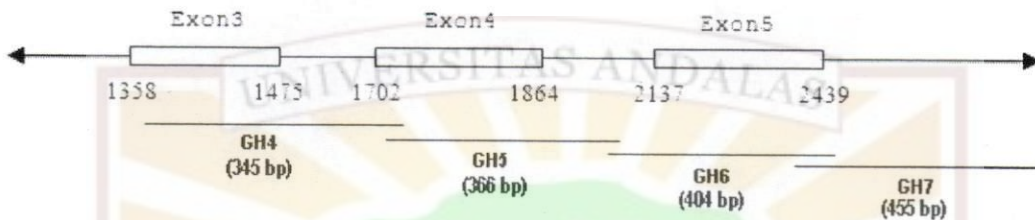


Keterangan : M = marker 25 ng/μl, S1-S12= sampel individu

Gambar 5. Elektroforesis hasil penyamaan konsentrasi sampel (10 ng/μl)

4.4. Amplifikasi Fragmen Gen Hormon Pertumbuhan

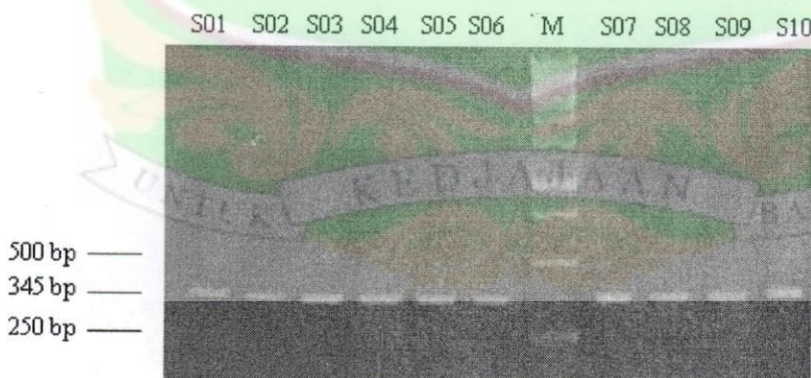
Setelah DNA diisolasi maka diamplikasi dengan menggunakan empat pasang primer (GH4, GH5, GH6, dan GH7) yang meliputi exon 3 sampai daerah ujung. Posisi dan panjang fragmen untuk masing-masing pasangan primer dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 6. Posisi dan panjang fragmen untuk masing-masing pasangan Primer (GH4 – GH7) berdasarkan sekuen Gordon *et al.* (1983)

4.4.1. Amplifikasi Daerah Exon3 Intron 3 dengan Pasangan Primer GH4L dan GH4R

Amplifikasi fragmen exon 3 dan intron 3 dengan pasangan primer GH4L dan GH4R dilakukan pada temperature annealing 62°C. Sebagai contoh elektroforesis hasil amplifikasi 10 sampel DNA Sapi Pesisir dapat dilihat pada Gambar 7 berikut.



Keterangan : M = marker, S1 – S16 = sampel individu

Gambar 7. Elektroforesis 2 μ l fragmen exon 3 intron 3 gen GH hasil amplifikasi dengan pasangan primer GH4L dan GH4R

Dari Gambar 7 terlihat semua sampel teramplifikasi dengan baik. Selanjutnya dilakukan amplifikasi terhadap 50 sampel lainnya. Dari hasil elektroforesis ternyata dari keseluruhan 60 sampel yang diampikasi hanya 57 sampel yang teramplifikasi sedangkan 3 sampel tidak bisa diampikasi.

Proses amplifikasi dinyatakan berhasil apabila dalam satu slot blok gel (sumur) terlihat satu pita DNA atau satu fragmen yang ukurannya sesuai dengan yang diharapkan saat primer didesain untuk mengampliksi daerah yang akan diampikasi. Suatu primer dikatakan tidak spesifik, apabila menghasilkan produk amplifikasi lebih dari satu fragmen, atau panjang fragmen tidak sesuai dengan prediksi saat primer didesain. Keberhasilan suatu amplifikasi selain ditentukan oleh pereaksi yang digunakan juga sangat ditentukan oleh penempelan primer pada *binding site* nya, jika primer tidak menempel oleh suatu sebab misalnya telah terjadi mutasi pada *binding site* maka amplifikasi akan gagal. Karena amplifikasi dilakukan pada suhu annealing yang sama dan semua sampel menggunakan pereaksi yang sama, adanya sampel yang tidak teramplifikasi ini kemungkinan karena adanya mutasi pada *binding site* DNA template sehingga tidak terjadi pembentukan DNA sintesis.

Dari semua sampel yang teramplifikasi dengan baik dan sepertinya fragmen yang terbentuk sudah spesifik karena dari hasil elektroforesis hanya satu pita yang terbentuk dengan panjangnya sesuai dengan yang diharapkan (345 bp). Untuk melihat urutan nukleotida fragmen yang diampikasi, sampel selanjutnya disekuensing dengan mesin sequencer di Lembaga Biologi Moleculer Eijkman Jakarta. Dari 6 sampel yang dikirim hanya 3 sampel yang bisa dibaca sekuennya. Walaupun 3 sampel bisa dibaca sekuennya akan tetapi grafiknya sama sekali tidak

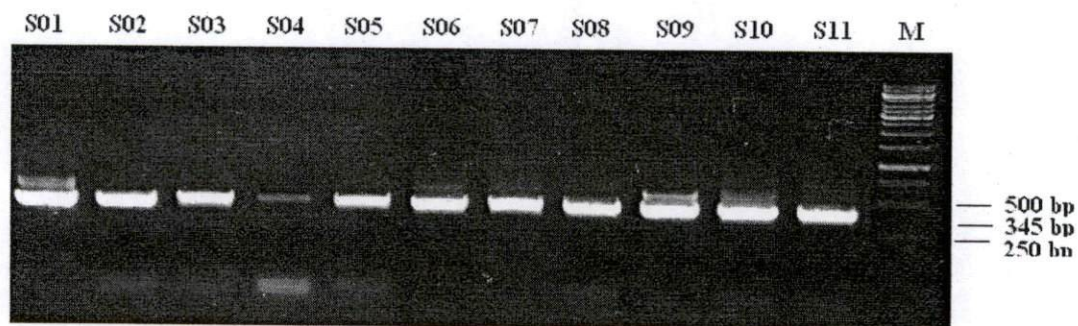
bisa dibaca sehingga kualitas sekuen tidak bisa dianalisis yang mengindikasikan kualitas sekuen tidak bagus. Akan tetapi sekuen memiliki tingkat kesamaan yang tinggi dengan sekuen Gordon *et al* (1983) yaitu 99 %. (Gambar 8)

Ada banyak alasan tidak berhasilnya proses sekuensing salah satunya adalah rendahnya kualitas template DNA hasil amplifikasi karena mengandung beberapa fragmen (http://www.nucleics.com/DNA_sekuensing_support/DNA-sekuensing-mixed-template.html). Kualitas hasil amplifikasi PCR selain dilihat dari jumlah pita yang dapat diidentifikasi juga dapat dilihat dari resolusi fragmen DNA yang dihasilkan. Dari hasil pengamatan terhadap hasil amplifikasi terlihat ada beberapa sampel yang resolusi rendah yaitu sampel S15.



Gambar 8. Sekuen gen GH intron 3 exon 3 hasil amplifikasi dengan pasangan primer GH4L dan GH4R

Untuk melihat adanya fragmen lain yang teramplifikasi dalam proses PCR, dilakukan elektroforesis semua produk hasil amplifikasi (25 µl) yang hasilnya dapat dilihat pada Gambar 9.



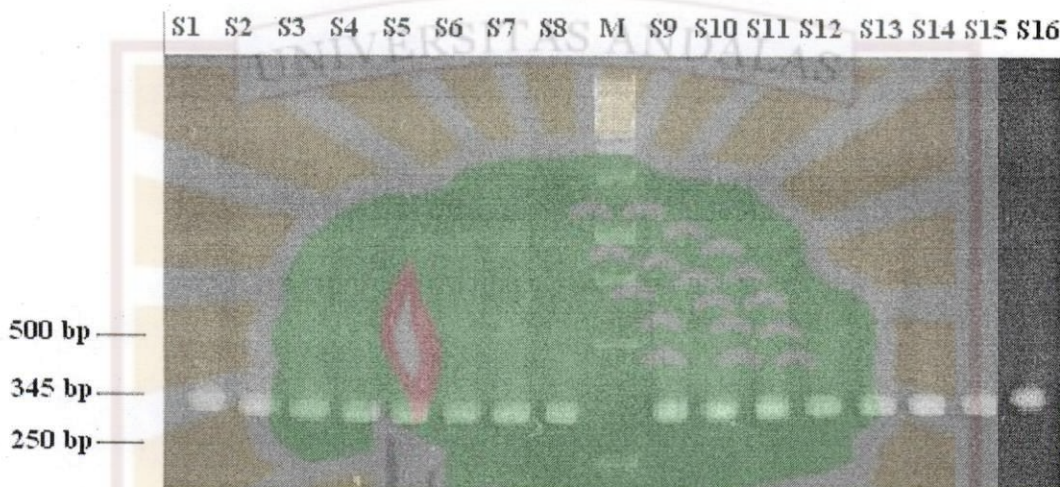
Keterangan : M = Marker , S1-S11 = sampel individu

Gambar 9. Elektroforesis 25 μ l produk PCR gen hormon pertumbuhan intron 3 exon 3 hasil amplifikasi menggunakan pasangan primer GH4L dan GH4R

Dari Gambar 9 terlihat hasil amplifikasi dengan pasangan primer GH4L dan GH5R tidak menghasilkan fragmen yang spesifik, pada semua sampel minimal ada 2 fragmen yang teramplifikasi. Banyaknya fragmen ini tentu akan sangat berpengaruh terhadap kualitas hasil sekuensing. Tidak terdeteksinya keberadaan fragmen pada hasil amplifikasi karena jumlah sampel yang dielektroforesis sangat sedikit (2 μ l), sehingga waktu dielektroforesis sangat tipis sekali sehingga sulit dilihat dengan mata telanjang. Primer yang digunakan adalah primer yang digunakan oleh Yao *et al.* (1996) dengan annealing temperature 60°C, yang tidak melaporkan adanya fragmen tambahan pada waktu elektroforesis hasil amplikasi. Berbedanya hasil yang diperoleh diduga karena perbedaan pereaksi yang digunakan, Yao menggunakan pereaksi yang dicampur sendiri, sedangkan pada penelitian ini menggunakan RTG-PCR kit yang memiliki sensitifitas yang lebih tinggi.

Untuk memurnikan fragmen maka gel yang diduga berisi fragmen yang diinginkan dipotong dengan *scalpel* steril dan di purifikasi dengan Nucleo Spin II Kit. Untuk memastikan hasil purifikasi berjalan menurut semestinya dilakukan lagi elektroforesis terhadap 2 μ l fragmen hasil pemurnian. Hasil elektroforesis

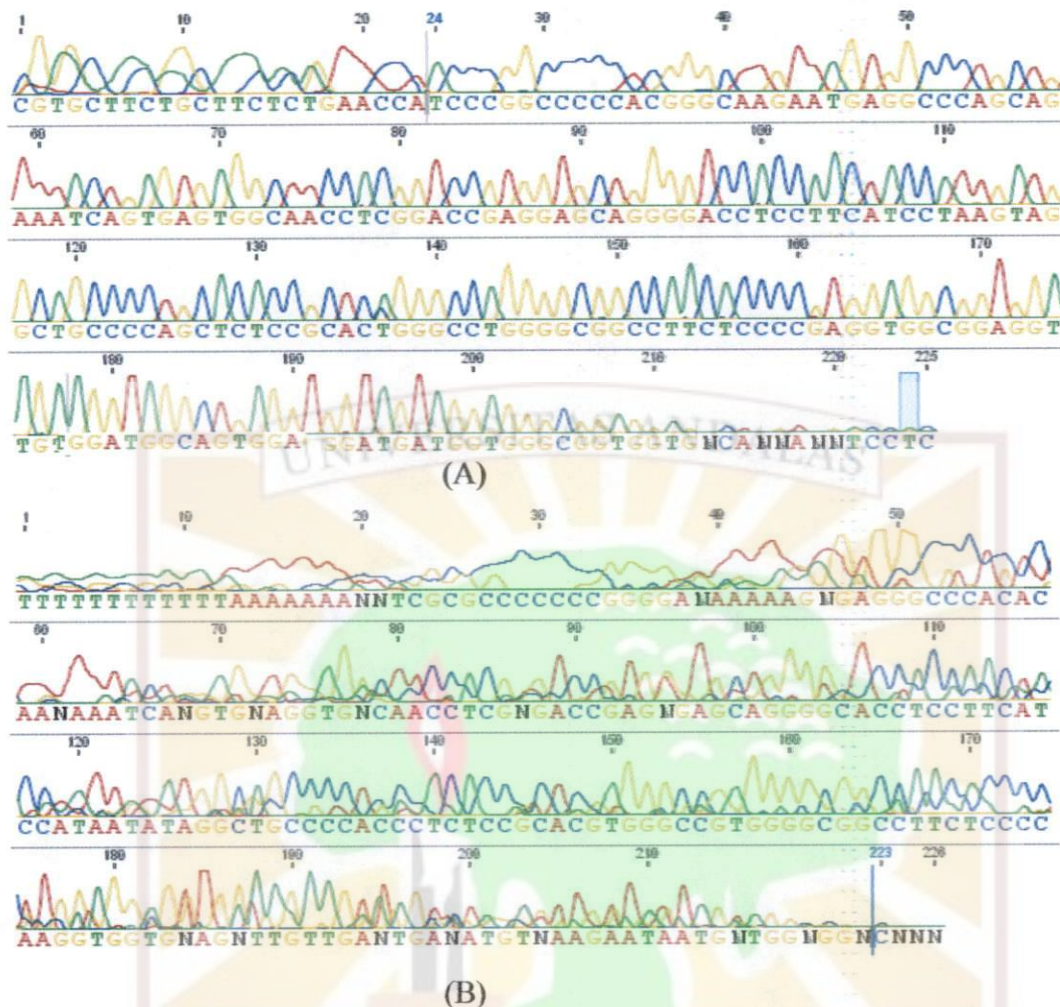
memperlihatkan hasil purifikasi berjalan seperti yang diharapkan karena berhasil mempurifikasi fragmen DNA dari gel dengan cukup baik dimana sekitar 90% fragmen DNA berhasil dipisahkan dari gel (Gambar 10). Hasil purifikasi ini dikirim ke SeqLab Laboratories Gottingen Jerman untuk di sekuensing. Semua sampel yang dikirim berhasil disekuensing dengan kualitas yang cukup baik.



Keterangan : M = Marker , S1-S16 = sampel individu

Gambar 10. Elektroforesis 2 μ l produk PCR gen hormon pertumbuhan intron 3 exon 3 hasil amplifikasi menggunakan pasangan primer GH4L dan GH4R hasil purifikasi

Hasil sekuensing fragmen yang telah dipurifikasi dengan Nucleo Spin II Kit memperlihatkan hasil yang lebih baik dibanding dengan hasil sekuensing fragmen yang tidak dipurifikasi. Sebanyak 57 sampel yang disekuensing 54 diantaranya *electropherogram* cukup bagus dan 3 sampel diantaranya dengan kualitas *electropherogram* nya jelek. Contoh *electropherogram* hasil sekuesnsing yang kuliatas baik dapat dilihat pada Gambar 12 bagian (A) dan yang jelek pada bagian (B). *Electropherogram* yang bersih memiliki ciri sebagai berikut: 1) jarak/spasi antar peak yang sama, 2) setiap peak hanya terdiri dari satu warna, 3) ketinggian *peak* bisa bervariasi hingga berbeda 3 kali lipat antara *peak* tertinggi dengan



Gambar 11. Electropherogram hasil Sekuensing gen hormon pertumbuhan intron 3 exon 3 hasil amplifikasi menggunakan pasangan primer GH4L dan GH4R kualitas baik (A) dan kualitas jelek (B)

terendah, 4) mungkin saja terdapat *peak-peak noise* pada *baseline*, namun jika kualitas template dan primernya bagus bisanya noise ini sangat minim dan tidak berpengaruh secara signifikan terhadap pembacaan.

<http://sciencebiotech.net/interpretasi-chromatogram-hasil-dna-sekuensing/>.

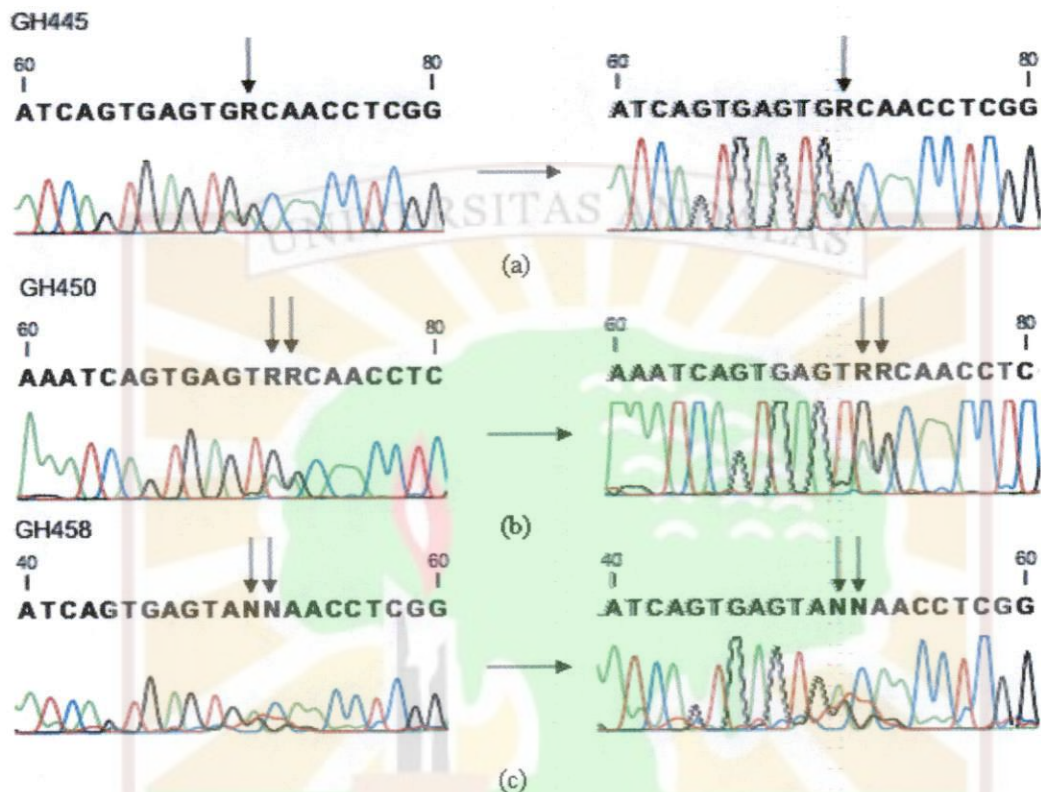
Pada Gambar 11 bagian (A), jarak space antara *peak* hampir sama, setelah basa ke 24 setiap *peak* mempunyai satu warna, dan tidak ada *noise* pada *baseline*. Jadi bisa disimpulkan kualitas sekuen cukup baik, sedangkan pada Gambar 11 bagian (B) terlihat pada setiap *peak* pada bagian bawahnya ada 1 atau 2 warna, hal

ini mengindikasikan ada fragmen lain yang ikut pada proses sekuensing, dengan kata lain fragmen yang teramplifikasi tidak spesifik. Pada bagian akhir *electropherogram* resolusi peak semakin buruk, ini merupakan keterbatasan dari teknologi *capillary sekuensing* yang berbasis metode dye terminator sekuensing. Peak yang sempurna sekalipun hanya memberikan data yang akurat hingga batas tertentu, selanjutnya *peak-peak* yang muncul akan semakin melebar dan bergeser sehingga software maupun mata manusia akan sulit untuk menginterpretasikan *electropherogram* tersebut secara akurat. Hasil pembacaan software pun seringkali tidak dapat diandalkan

Data sekuen hasil sekuensing perlu diedit walaupun *electropherogram* ini sudah diinterpretasikan (*call*) secara otomatis oleh program computer DNA Sequencer menjadi urutan-urutan basa nukleotida (A-C-G-T), namun masalahnya seringkali program komputer melakukan 'kesalahan' interpretasi pada *electropherogram* yang bermasalah sehingga urutan basa nukleotida yang dihasilkannya pun bisa salah. Hal ini tentu saja berpengaruh terhadap analisis lanjutan yang akan dilakukan terhadap hasil sekuensing (<http://sciencebiotech.net/interpretasi-chromatogram-hasil-dna-sekuensing/>).

Beberapa contoh kesalahan pembacaan oleh program komputer dapat dilihat pada Gambar 12. Pada Gambar 12 (a) pada posisi 71 komputer membacanya sebagai R (A atau G), setelah diperbesarnya berdasarkan warna dan puncak *electropherogram* bisa diambil kesimpulan basanya adalah G. Sedangkan Gambar 12 (b) pada posisi 73-74 komputer juga ragu sekuennya apakah AA atau GG dan setelah *electropherogram* nya diperbesar jelaslah sekuennya adalah GG, sedangkan pada Gambar 14 (c) pada posisi 51 pembacaan komputer yang

sebelumnya NN setelah diperbesar terlihat sebagai AC. Setelah dilakukan pengeditan, diperoleh rata-rata basa yang masing ambigu adalah 0,24 bp dan rata-rata panjang sekuen yang bisa dianalisis 213 bp.



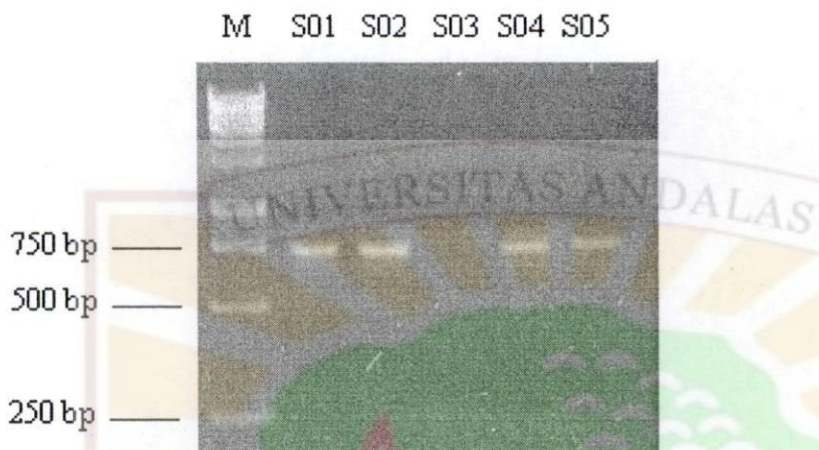
Gambar 12. Beberapa kesalahan pembacaan mesin Sequencer

4.4.2. Amplifikasi Exon 4, Intron 4, dan Exon5 dengan Pasangan Primer GH5L dan GH6R

Untuk menghemat biaya sebelum amplifikasi dengan pasangan primer GH5L dan GH5R terlebih dulu dicoba mengamplifikasi exon 4 sampai exon 5 (751 bp) dengan menggunakan pasangan primer GH5L dan GH6R. Jika ini berhasil maka amplifikasi dengan pasangan primer GH6L dan GH6R tidak perlu dilakukan.

Menggunakan gradient PCR diperoleh temperature yang memberikan produk yang paling baik adalah 62°C. Selanjutnya dilakukan amplifikasi untuk semua sampel. Untuk memastikan hasil amplifikasi, sebanyak 2 µl masing-masing sampel hasil

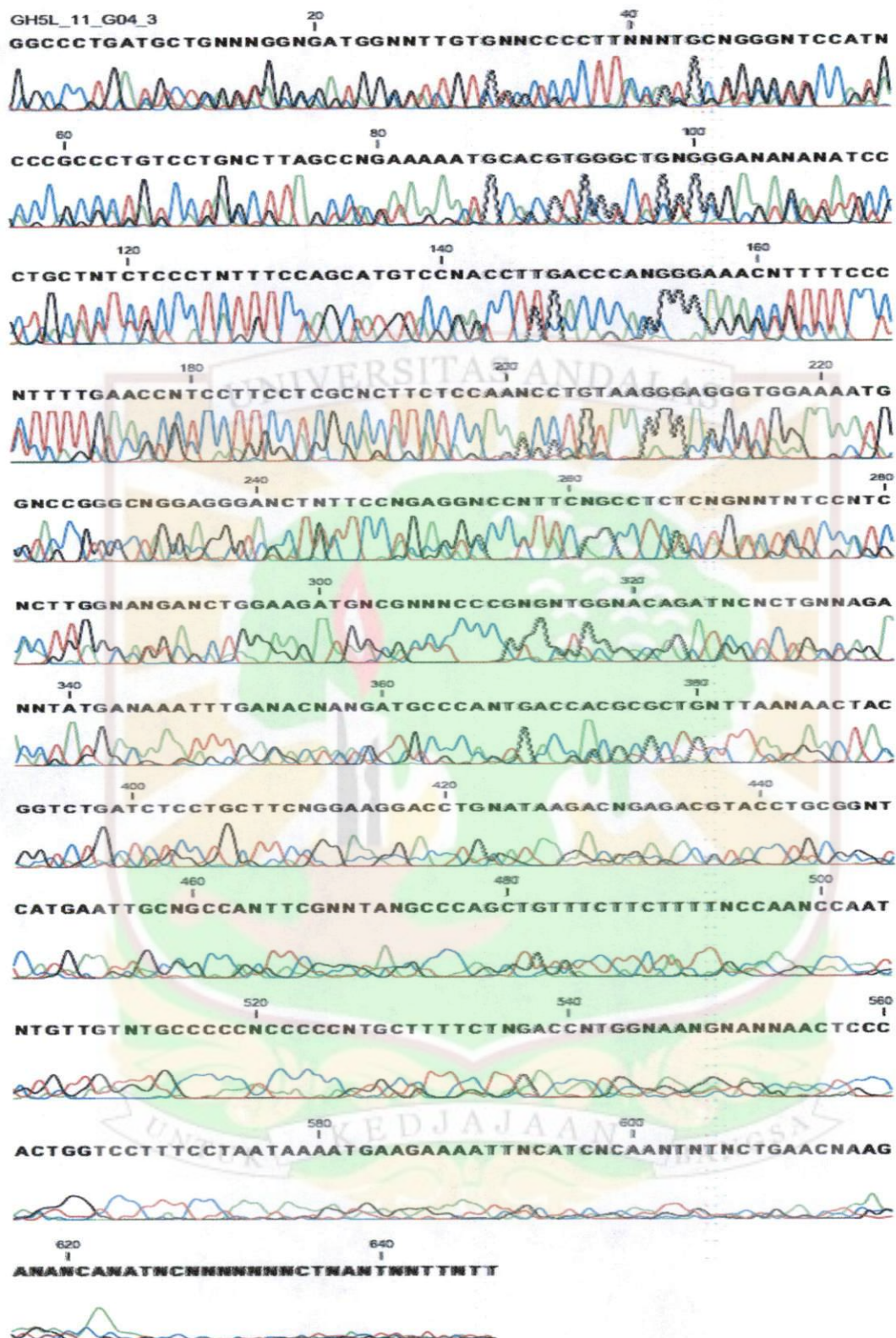
amplifikasi dielektroforesis dengan agarose 1% pada buffer 0,5 x TBE menggunakan tegangan 100 volt selama 30 menit. Hasil elektroforesis dapat dilihat pada Gambar 13.



Keterangan : M = Marker , S01-S05 = sampel individu

Gambar 13. Elektroforesis 2 μ l produk PCR gen hormon pertumbuhan exon 4, intron 4, dan exon5 hasil amplifikasi menggunakan pasangan primer GH5L dan GH6R

Dari Gambar 13 sepertinya amplifikasi dengan menggunakan pasangan primer GH5L dan GH6R menghasilkan fragmen yang spesifik dengan panjang 751 bp dan terlihat ada satu sampel yang tidak teramplifikasi yaitu sampel S03. Tidak teramplifikasinya sampel ini diduga karena terjadinya mutasi pada binding site primer. Fragmen hasil amplifikasi ini selanjutnya dikirim ke Charon Pophand Jakarta untuk disekuensing. Dari 54 sampel yang yang dikirim ada 49 sampel yang bisa dibaca, akan tetapi kualitasnya tidak terlalu bagus (Gambar 14) dan yang bisa diedit hanya 10 sampel. Pada Gambar 14 terlihat pada setiap peak pada bagian bawahnya ada 1 atau 2 warna dan banyak ditemukan peak-peak yang *ambigu* yang puncaknya berdempetan sehingga program komputer mendeteksinya sebagai N. Hal ini mengindikasikan adanya fragmen lain yang ikut pada proses sekuensing, dengan



Gambar 14. *Electropherogram* hasil sekuensing gen hormon pertumbuhan exon 4, intron 4, dan exon5 hasil amplifikasi menggunakan pasangan primer GH5L dan GH6R

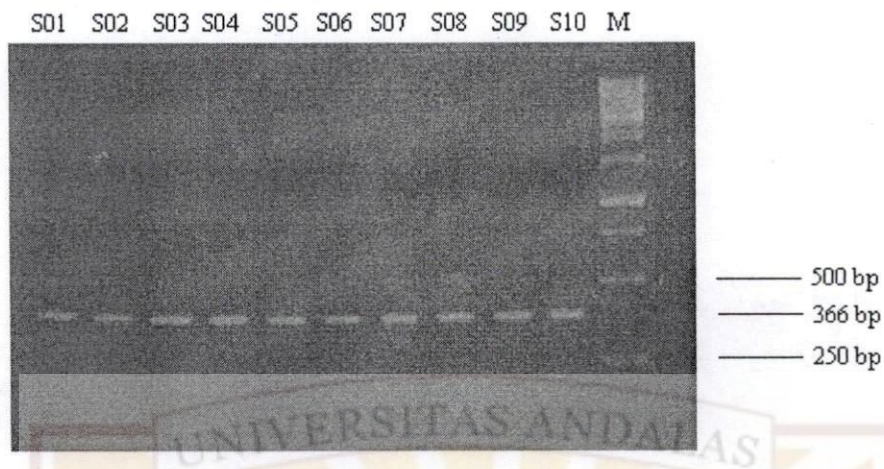
kata lain fragmen yang teramplifikasi dengan menggunakan pasangan primer GH5L dan GH6R tidak spesifik.

Fragmen lain yang terikut pada proses amplikasi tidak terdeteksi pada waktu elektroforesis karena pada proses elektroforesis jumlah produk amplikasi yang dielektroforesis hanya 2 μ l, sehingga tidak terlihat pada gel elektroforesis. Untuk mendapatkan hasil sekuensing yang baik menggunakan pasangan primer ini perlu dilakukan pemurnian produk amplifikasi sehingga fragmen yang dikirim untuk sekuensing hanya berisi fragmen yang diinginkan saja.

Karena amplifikasi menggunakan pasangan primer GH5L dan GH6R tidak menghasilkan fragmen yang spesifik maka dilakukan amplifikasi dengan menggunakan pasangan primer GH5L dan GH5R yang akan mengamplifikasi daerah exon 4 dan sebagian intron 4 sepanjang 366 bp.

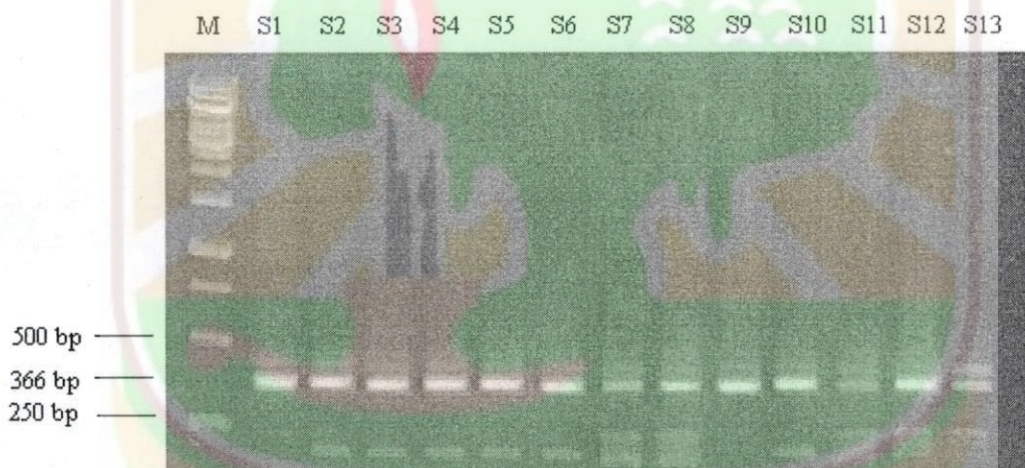
Dengan gradient PCR diperoleh temperature yang memberikan produk yang paling baik pada amplifikasi dengan pasangan primer GH5L dan GH5R adalah pada 62°C. Temperatur annealing ini digunakan untuk mengamplifikasi semua sampel dengan pasangan primer GH5L dan GH5R.

Elektroforesis hasil amplifikasi dengan pasangan primer GH5L dan GH5R yang meliputi daerah exon 4 dan sebahagian intron 4 dapat dilihat pada Gambar 15. Dari Gambar 15 sepertinya amplifikasi dengan menggunakan pasangan primer GH5L dan GH5R menghasilkan fragmen yang spesifik dengan panjang 366 bp. Akan tetapi jika 25 μ l produk amplifikasi dielektroforesis (Gambar 16), ternyata terlihat fragmen hasil amplikasi tidak spesifik, minimal ada dua fragmen yang teramplifikasi, sampel S1 dan S10, juga ada 3 fragmen yang terbentuk, sampel S2, S3, S4, S5, S6 malahan ada yang terbentuk empat fragmen yaitu sampel S7, S8,



Keterangan : M = Marker , S01-S10 = sampel individu

Gambar 15. Elektroforesis 2 μ l produk PCR hasil amplifikasi gen GH daerah exon 4 dan sebagian intron 4 dengan pasangan primer GH5L dan GH5R.



Keterangan : M = Marker , S1-S13 = sampel individu

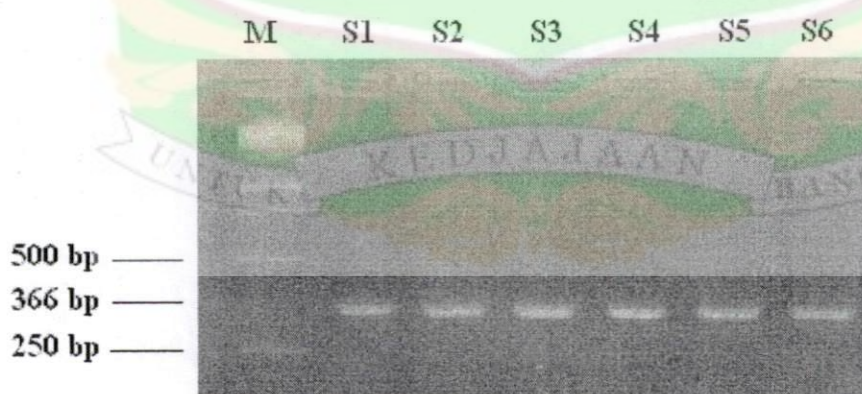
Gambar 16. Elektroforesis 25 μ l produk PCR gen hormon pertumbuhan daerah exon 4 dan sebahagian intron 4 menggunakan primer GH5L dan GH5R.

S10, S11, S12, S13, dan S14. Seperti halnya pada fragmen GH4 primer yang digunakan juga primer yang digunakan oleh Yao *et al.* (1996) yang tidak melaporkan adanya fragmen tambahan pada waktu elektroforesis hasil amplikasi. Banyaknya fragmen yang terbentuk pada proses amplifikasi menunjukkan pasangan primer GH4 dan GH5 yang digunakan tidak cukup spesifik dalam

mengamplifikasi daerah yang diinginkan. Perbedaan hasil yang diperoleh diduga karena penelitian ini menggunakan RTG-PCR kit yang memiliki sensitifitas yang sangat tinggi.

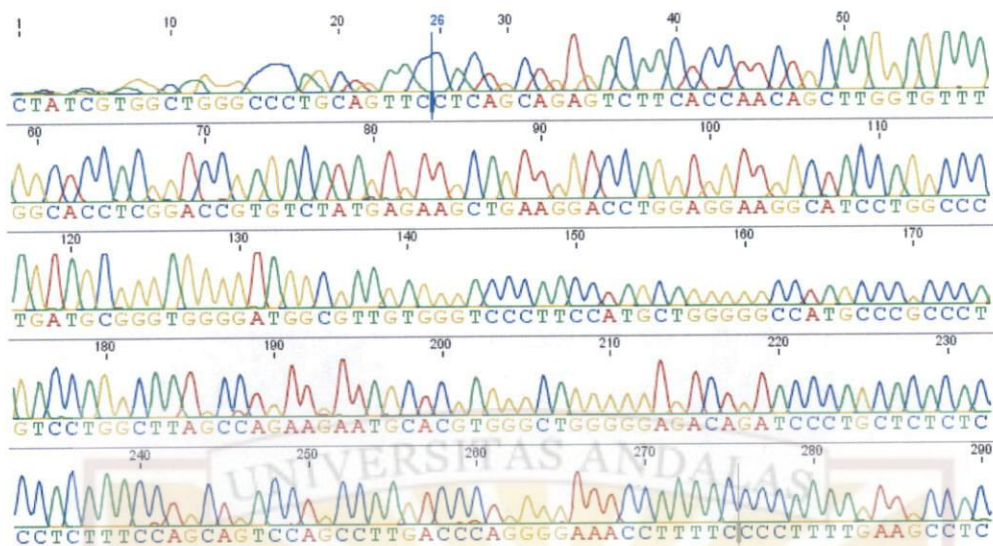
Agar produk amplifikasi hanya berisikan fragmen tunggal yang diinginkan, maka fragmen yang diperkirakan berisi fragmen yang diharapkan dipotong dengan *scalpet* steril, kemudian di purifikasi dengan Nucleo Spin II Kit. Untuk menghasilkan fragmen dengan konsentrasi tinggi hasil purifikasi dijadikan 15 μ l dan untuk memastikan proses purifikasi berjalan dengan semestinya, dilakukan elektroforesis terhadap 2 μ l hasil purifikasi (Gambar 17)

Dari Gambar 17 terlihat proses purifikasi berjalan cukup baik dan menghasilkan fragmen DNA dengan konsentrasi DNA yang cukup tinggi. Selanjutnya fragmen DNA dikirim ke SeqLab Laboratories Gottingen Jerman untuk dilakukan proses sekuensing. Dari 50 sampel yang dikirim, semuanya bisa disekuensing. Sebanyak 48 sampel memperlihatkan kualitas baik hanya 2 sampel dengan kualitasnya jelek. Contoh *Electropherogram* kualitas bagus dan yang kualitasnya tidak bagus dapat dilihat pada Gambar 18.

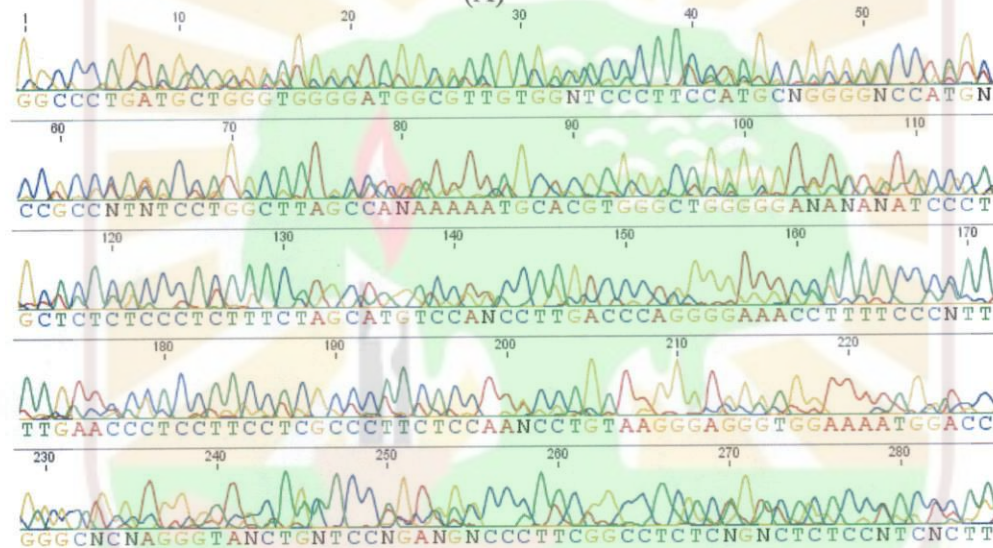


Keterangan : M = Marker, S1 – S6 = Sampel Individu

Gambar 17. Elektroforesis 2 μ l produk PCR gen hormon pertumbuhan daerah exon 4 dan sebagian intron 4 menggunakan primer GH5L dan GH5R hasil purifikasi



(A)



(B)

Gambar 18. Perbandingan *electropherogram* hasil Sekuensing gen GH daerah exon 4 dan sebahagian intron 4 hasil amplifikasi menggunakan primer GH5L dan GH5R kualitas bagus (A) dan jelek (B)

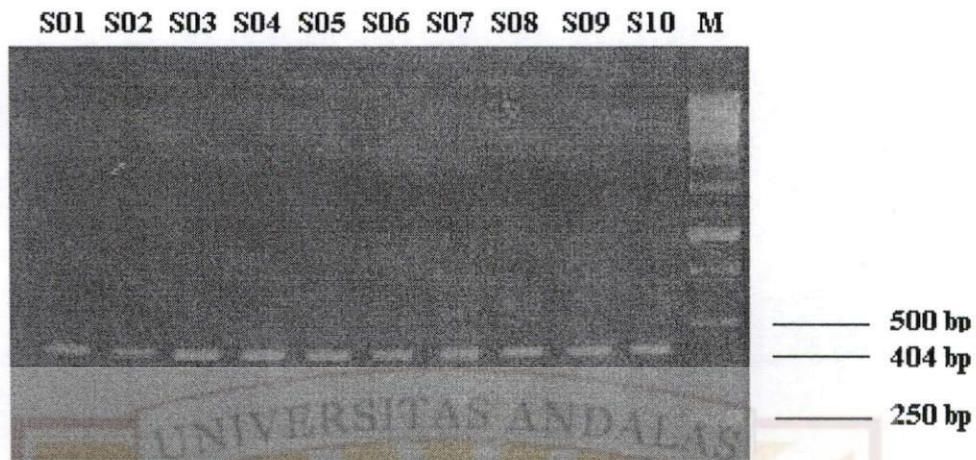
Hasil analisis DNA sekuensing idealnya terdiri atas peak-peak yang terbaca dengan jelas, memiliki *baseline noise* rendah, dan memiliki spasi antar peak yang merata. Pada Gambar 18 bagian (A) terlihat *peak-peak electropherogram* hanya mempunyai satu warna, dan jarak antar *peak* hampir sama, dan tidak ada noise pada bagian bawah *electropherogram*, yang menandakan

kualitas dari sekuensing cukup baik. Sedangkan pada Gambar 18 bagian (B) terlihat banyak *peak* yang mempunyai warna yang berdempetan sehingga komputer membacanya sebagai N, dan pada bagian bawah *electropherogram* terdapat *noise* yang cukup mengganggu yang mengindikasikan kualitas sekuen tidak bagus.

Banyaknya *peak* mempunyai warna yang berdempetan diduga karena masih ada fragmen lain yang ikut serta dalam proses sekuensing, yang mungkin disebabkan karena kekuranghatian dalam memotong gel hasil elektroforesis, untuk itu khusus untuk sampel yang kualitas sekuensing tidak bagus diampifikasi ulang, dielektroforesis, dipotong gelnya, dan dipurifikasi. Selanjutnya dilakukan sekuensing ulang, dari dua sampel yang disekuensing ulang hasilnya satu sampel hasil sekuensing cukup bagus dan satu lagi hasilnya tidak begitu bagus tapi masih bisa diedit, sehingga keduanya masih bisa diikuti dalam analisis.

4.4.3. Amplifikasi Sebagian Daerah Intron 4 dan Exon 5 dengan Pasangan Primer GH6L dan GH6R

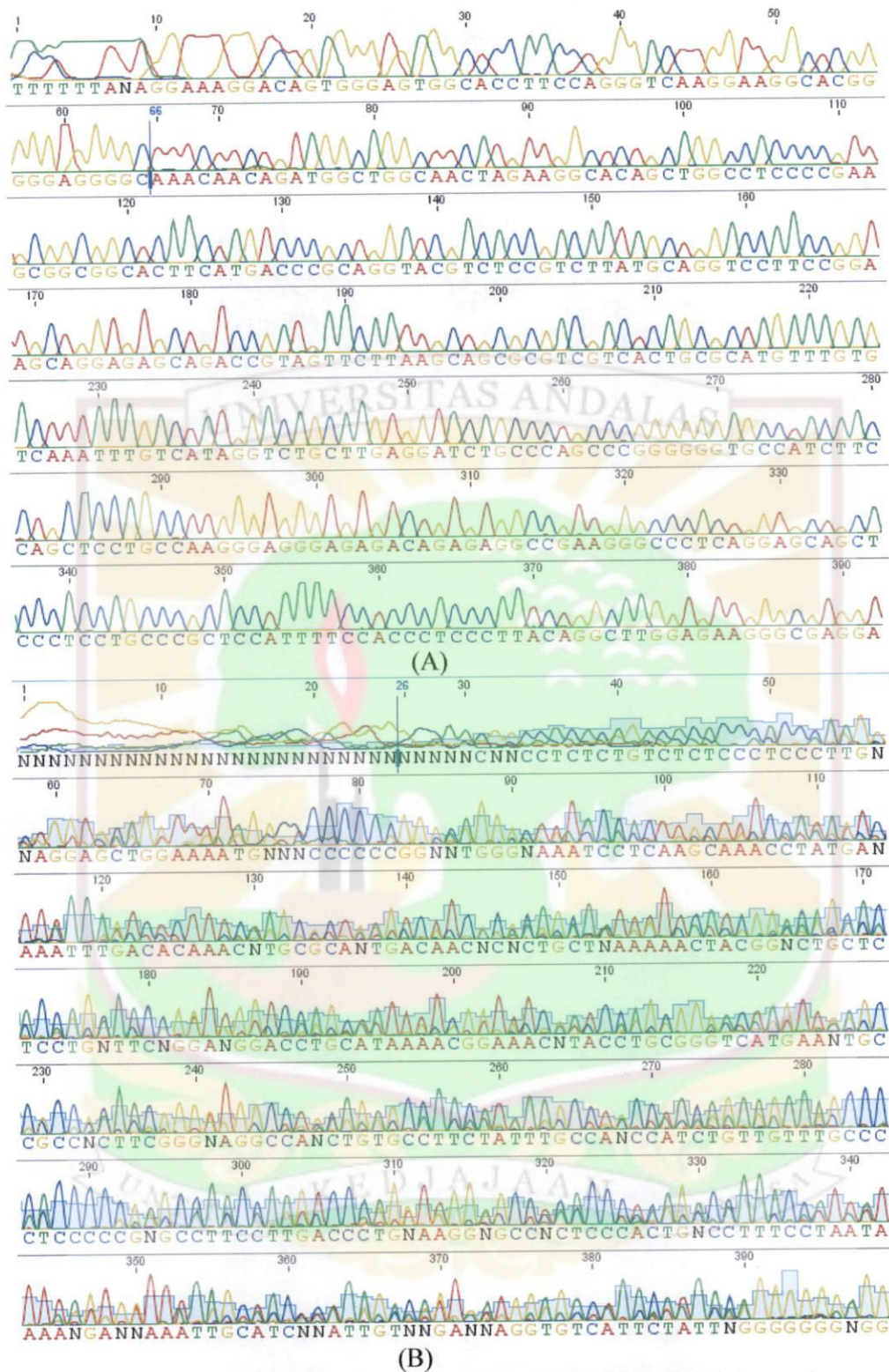
Menggunakan sekuens Gordon *et al.* (1983) sebagai dasar analisis pasangan primer GH6L dan GH6R mengamplifikasi daerah intron 4 dan sebagian Exon 5 sepanjang 404 bp. Menggunakan gradient PCR, diperoleh temperatur annealing yang optimal untuk pasangan primer GH6L dan GH6R adalah 62°C. Hasil amplifikasi diperoleh fragmen sepanjang 404 bp. Untuk memastikan apakah semua sampel teramplifikasi dilakukan elektroforesis terhadap 2 µl produk amplifikasi (Gambar 19).



Keterangan : M = Marker , S01-S10 = sampel individu

Gambar 19. Elektroforesis 2 μ l hasil amplifikasi sebagian daerah intron 4 dan exon 5 dengan pasangan primer GH6L dan GH6R.

Gambar 19 memperlihatkan produk amplifikasi dengan menggunakan pasangan primer GH6L dan GH6R menghasilkan fragmen yang spesifik dengan panjang 404 bp. Fragmen ini selanjutnya dikirim ke Lembaga Biologi Moleculer Eijkman Jakarta untuk disekuensing. Dari 54 sampel yang dikirim ada 10 sampel yang bisa dibaca, akan tetapi kualitasnya tidak terlalu bagus (Gambar 20 bagian (B)), sedangkan yang lainnya sama sekali tidak bisa dibaca. Pada Gambar 20 bagian (B) terlihat pada bagian awal program tidak bisa membaca dan terbaca sebagai N, setelah basa yang ke 30, sekuen sudah relatif lebih baik walaupun masih ada *noise* pada bagian bawah, tapi masing-masing *peak* sudah terbaca dengan baik, karena tidak ada *peak* yang mempunyai warna yang sama. Pada bagian awal sekuen *electropherogram* sangat kacau dimana komputer sama sekali tidak membaca sehingga program komputer membacanya sebagai N, yang mengindikasikan adanya fragmen lain yang ikut pada proses sekuensing. Dengan kata lain fragmen yang teramplifikasi dengan menggunakan pasangan primer GH6L dan GH6R juga tidak spesifik. Hasil yang sama diperoleh pada amplifikasi menggunakan pasangan primer



Gambar 20. *Electropherogram* hasil Sekuensing sebahagian daerah intron 4 dan exon 5 hasil amplifikasi menggunakan primer GH6L dan GH6R kualitas bagus (A) dan jelek (B)

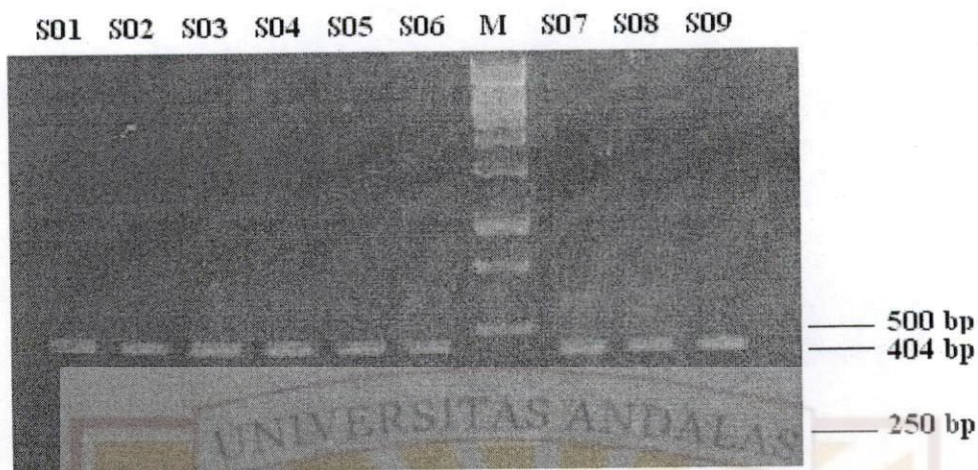
GH4L dan pasangan primer GH5 yang menunjukkan ke 3 pasang primer tidak spesifik jika menggunakan menggunakan RTG-PCR kit yang memiliki sensitifitas yang tinggi.

Untuk mendapatkan fragmen yang spesifik, seperti halnya pada fragmen GH4 dan GH5, semua produk amplikasi PCR dielektroforesis, dipotong, dan selanjutnya dipurifikasi. Fragmen hasil purifikasi ini selanjutnya dikirim ke SeqLab Laboratory Gottingen Jerman untuk disekuensing. Hasil sekuensing fragmen yang telah dipurifikasi memperlihatkan kualitas lebih baik dibanding dengan hasil sekuensing produk PCR yang tidak dipurifikasi (Gambar 20 bagian (A))

4.4.4. Amplifikasi Daerah Flanking 3' Gen GH Dengan Pasangan Primer GH7L dan GH7R

Pasangan primer GH7L dan GH7R akan mengamplifikasi pada daerah flanking 3' gen hormone pertumbuhan sepanjang 455 bp. Langkah pertama dalam proses amplikasi adalah menentukan temperature annealing yang optimal untuk pasangan primer GH7L dan GH7R. Dengan gradient PCR diperoleh temperature annealing optimal adalah 62°C. Selanjutnya dilakukan amplikasi dengan pasangan primer GH7L dan GH7R pada DNA genom. Untuk memastikan apakah semua sampel teramplifikasi dilakukan elektroforesis terhadap 2 µl produk amplifikasi (Gambar 21).

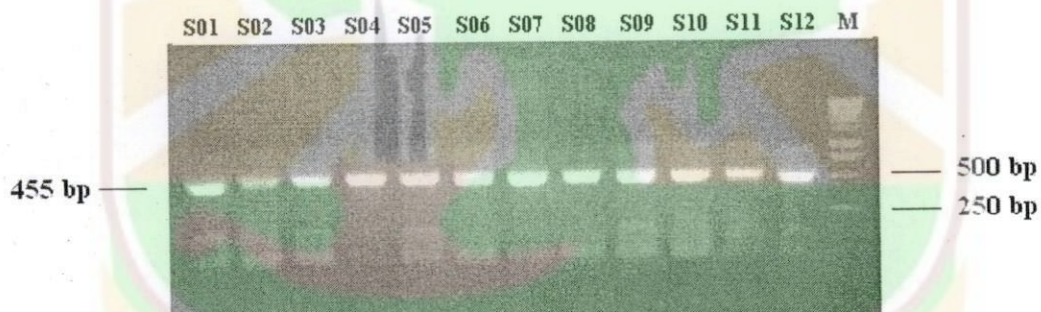
Dari Gambar 21 sepertinya amplifikasi dengan menggunakan pasangan primer GH7L dan GH7R menghasilkan fragmen yang spesifik dengan panjang 404 bp. Fragmen ini selanjutnya dikirim ke Lembaga Biologi Moleculer Eijkman Jakarta untuk disekuensing. Dari 4 sampel yang yang dikirim tidak ada satupun yang bisa dibaca karena kualitasnya terlalu buruk, hal ini diduga sama keadaannya



Keterangan : M = Marker , S01-S10 = sampel individu

Gambar 21. Elektroforesis 2 μ l hasil amplifikasi daerah ujung gen GH dengan pasangan primer GH7L dan GH76R.

dengan kondisi fragmen sebelumnya yaitu fragmen tidak spesifik. Untuk memastikan dilakukan elektroforesis terhadap semua produk amplifikasi (Gambar 22).



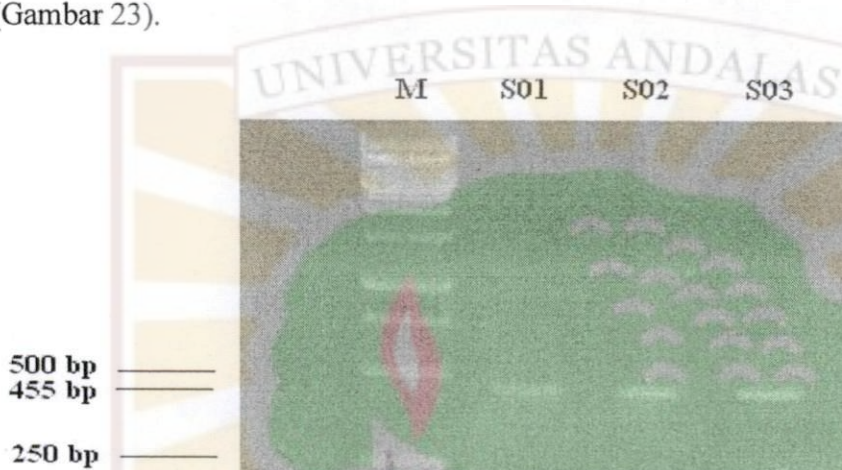
Gambar 22. Elektroforesis 25 μ l hasil amplifikasi daerah ujung gen GH dengan pasangan primer GH7L dan GH7R

Dari Gambar 22 terlihat produk amplifikasi memang tidak spesifik, setidaknya ada 2 atau tiga fragmen lain yang ikut teramplifikasi.

Adanya fragmen lain ini menyebabkan kualitas sekuensing sangat buruk sehingga sama sekali tidak bisa dibaca, dengan kata lain fragmen yang teramplifikasi dengan menggunakan pasangan primer GH7L dan GH7R juga tidak spesifik seperti halnya pada amplifikasi menggunakan pasangan primer GH4, GH5, dan GH6 yang

menunjukkan ke 4 pasang primer tidak cukup spesifik jika menggunakan menggunakan RTG-PCR kit yang memiliki sensitifitas yang tinggi.

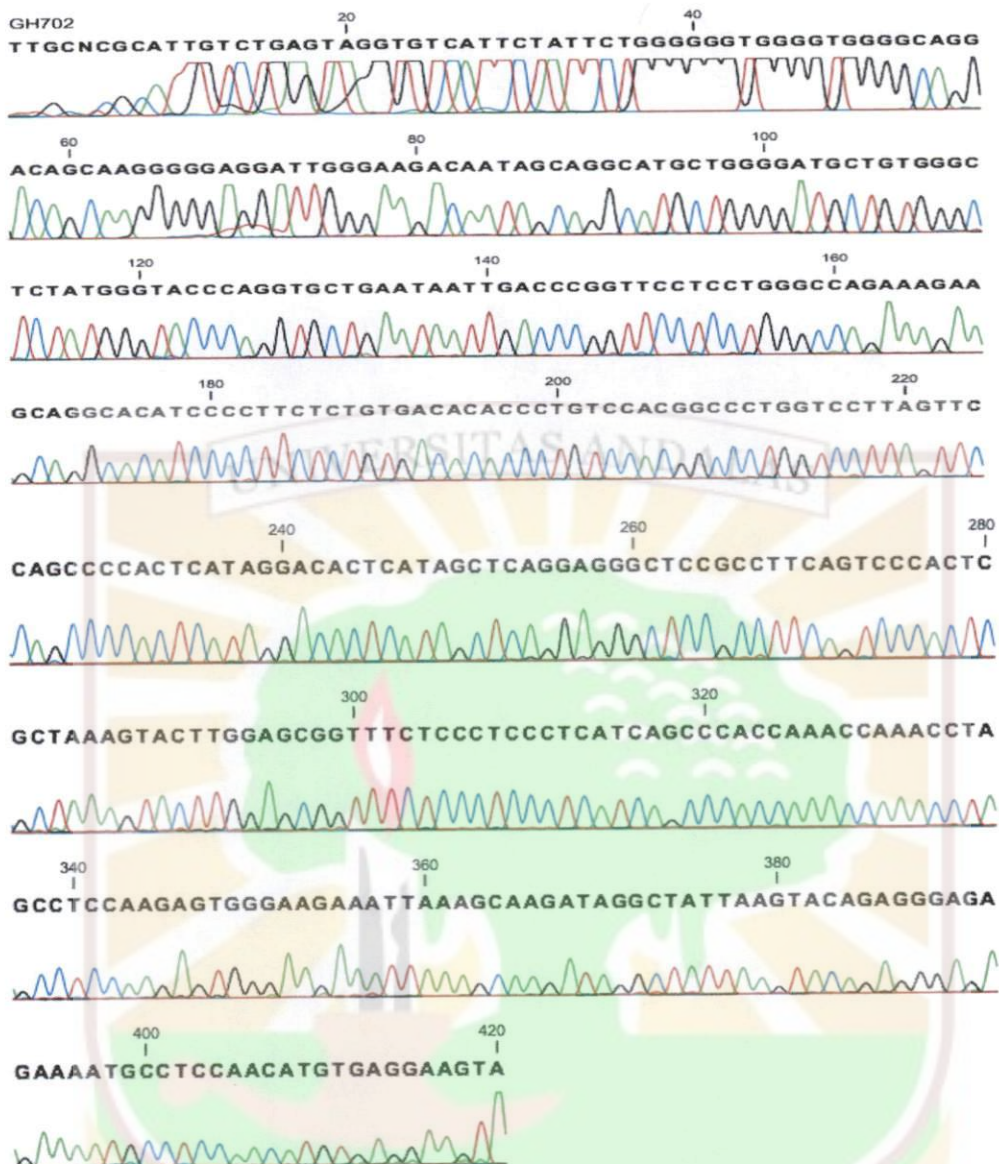
Untuk mendapatkan fragmen yang spesifik, seperti halnya pada fragmen GH4, GH5, dan GH6 semua produk amplikasi PCR dielektroforesis, dipotong, dan selanjutnya dipurifikasi, untuk memastikan hasil purifikasi di elektroforesis (Gambar 23).



Keterangan : M = Marker , S01-S03 = sampel individu

Gambar 23. Elektroforesis 2 μ l hasil amplifikasi daerah ujung gen GH dengan pasangan primer GH7L dan GH7R hasil purifikasi

Selanjutnya fragmen dikirim ke SeqLab Laboratory Gottingen Jerman untuk proses sekuensing. Hasil sekuensing jauh lebih baik dari sebelumnya dan semua sampel sampel berhasil disekuensing dengan kualitas yang cukup baik. Dari 60 sampel 55 diantaranya memiliki kualitas sekuensing cukup bagus, sedangkan 5 sampel lain agak kurang bagus karena dari *electropherogram* nya terlihat masih banyak *peak-peak* yang ambigu yang oleh program komputer dibaca sebagai N. Hal ini diduga karena ada fragmen lain yang panjangnya hampir sama dengan fragmen yang diinginkan ikut dalam proses sekuensing. Salah satu contoh hasil sekuensing dapat dilihat pada Gambar 24. Lima sampel yang kualitas sekuensingnya tidak terlalu bagus dilakukan pengeditan, 2 diantaranya harus diamplifikasi ulang, semua



Gambar 24. *Elektropherogram* hasil Sekuensing daerah ujung gen GH hasil amplifikasi menggunakan primer GH7L dan GH7R.

produk PCR-nya dielektroforesis dengan meningkatkan waktu elektroforesisnya sampai 60 menit dan selanjutnya gel yang berisikan fragmen yang diharapkan dipotong untuk dilakukan purifikasi dan selanjutnya disekuensing. Hasil sekuensing ternyata cukup bagus dibandingkan dengan hasil sekuensing sebelumnya.

4.5. Keragaman Sekuen dan Frekuensi Alel.

4.5.1. Polimorfisme Daerah Exon 3 dan Intron 3.

Amplifikasi PCR menggunakan pasangan primer GH4L dan GH4R menghasilkan fragmen sepanjang 345 bp, yang meliputi daerah Exon 3 dan Intron 3. Setelah disekuensing diperoleh sekuens yang panjangnya bervariasi dari 190 - 215 pasang basa. Untuk melihat kebenaran sekuens yang diperoleh adalah sekuens gen GH, maka hasil ini dibandingkan dengan sekuens Gordon *et al.* (1983). Dari hasil perbandingan diperoleh tingkat kesamaan 96-97% yang membuktikan bahwa sekuens yang teramplifikasi adalah benar sekuens dari gen GH. Hasil perbandingan (Lampiran 1) juga menunjukkan adanya 6 delesi, 8 insersi, dan 4 mutasi sebagaimana disajikan pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2. Keragaman sekuens fragmen GH4

No.	Sampel	Mutasi	Posisi	Frekuensi
1	17	Delesi A	1408	1.00
2	24	Delesi G	1410	1.00
3	24	Delesi T	1412	1.00
4	27	Delesi C	1414 or 1415	1.00
5	28	Delesi T	1419	0.07
6	44	Delesi A	1429	1.00
7	57	Insersi A	1467	0.04
8	57	Insersi G	1481	0.04
9	56	GG → AA	1482-1483	0.30
10	57	Insersi C	1508	0.03
11	57	Insersi A	1521	0.03
12	57	G → T	1524	0.03
13	57	Insersi A	1525	0.03
14	57	Insersi A or C	1539	0.03
15	57	Insersi T	1541	1.00
16	57	C → T	1547	0.95
17	57	Insersi G	1548-1550	1.00
18	55	C → T	1578	0.11

Dari Tabel 4.2 diatas dapat dikemukakan bahwa enam delesi A, G, T, C, T, dan A berturut-turut terjadi pada posisi 1408, 1410, 1412, 1414/1415, 1419, dan 1429 semuanya merupakan delesi baru yang belum ditemukan pada sekuen di *NCBI GenBank*.

Lima delesi diantaranya yaitu delesi A, G, T, C, A terjadi pada semua sampel yang dianalisis, sedangkan delesi T pada posisi 1419 hanya terjadi pada 2 sampel dari 28 sampel yang bisa dianalisis. Dari hasil analisis terungkap 6 delesi yang ditemui ini semuanya merupakan delesi baru. Delesi A pada posisi 1408, delesi G pada posisi 1410, delesi T pada posisi 1412, delesi C pada posisi 1414, dan delesi A pada posisi 1429 tidak ditemukan pada semua gen GH yang ada di *NCBI GenBank*. Delesi pada empat posisi ini menyebabkan terjadinya perubahan sekuen dari AGGTTGC menjadi GTGC pada daerah exon 3 yang belum pernah dilaporkan terjadi pada sekuen sapi lain, sehingga ada kemungkinan sekuen pada posisi ini bisa dijadikan sebagai marker untuk Sapi Pesisir. Terjadinya delesi pada daerah exon 3 tentu saja akan merubah struktur protein dari gen GH, perubahan struktur protein ini mungkin saja sebagai penyebab kecilnya tubuh Sapi Pesisir.

Dari Tabel 4.2. dapat dikemukakan terdapat adanya 4 mutasi baru yaitu mutasi GG \rightarrow AA pada posisi 1482, transversi G \rightarrow T pada posisi 1524, transisi C \rightarrow T pada posisi 1547 dan 1578 yang belum pernah dilaporkan pada semua sekuen gen GH di *NCBI GenBank*. Mutasi GG \rightarrow AA pada posisi 1482, transisi C \rightarrow T

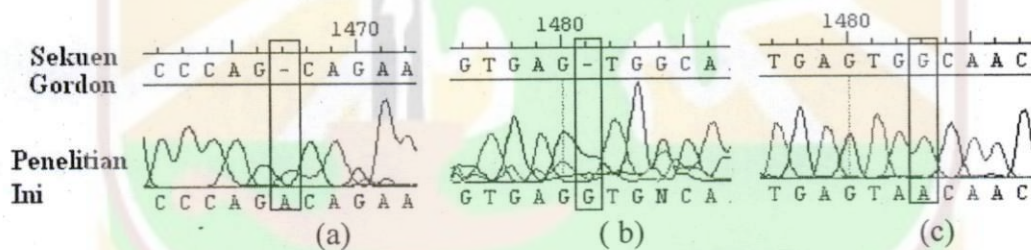
Gambar 25. Delesi pada posisi 1408 – 1429

Gambar 25. Delesi pada posisi 1408 – 1429

frekuensi alelnya kurang dari 0,05 (Hartl and Clark ,1989).

genetik untuk mengidentifikasi hubungan antara mutasi pada posisi ini dengan

sifat-sifat produksi yang bernilai ekonomis. Sedangkan deleksi T pada posisi 1419, insersi G pada posisi 1481 (Gambar 26 (a)), mutasi GG → AA (Gambar 26(c)) pada posisi 1482, transisi C → T pada posisi 1547 dan pada posisi 1578 semuanya bersifat polimorfik karena frekuensinya > 0,05. Setelah diuji dengan *Chi-Square* tidak ada satupun dari keragaman ini yang berhubungan dengan dua kelompok berat badan (Lampiran 7), hal ini disebabkan karena bobot badan tidak hanya dipengaruhi oleh gen GH, tapi dipengaruhi gen lainnya seperti GHR dan IGF1 (Ge *et al.*, 2003), disamping juga disebabkan sedikitnya sampel yang digunakan. dan juga disebabkan karena berat badan disamping dipengaruhi faktor genetik juga dipengaruhi oleh lingkungan. Walaupun demikian keragaman pada 5 posisi ini berpotensi untuk dijadikan marker genetic karena bersifat polimorfik dan dapat diuji lebih lanjut untuk dapat dijadikan kandidat marker.

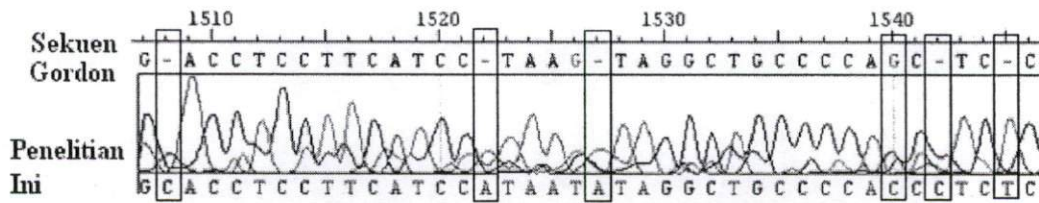


Gambar 26. Insersi pada posisi 1467, 1481 dan mutasi pada posisi 1482

Insersi pada posisi 1508 (Gambar 27) dapat dideteksi dengan enzim restriksi *FinI*(GGGAC), karena insersi ini merubah sisi pengenalan dari enzim *FinI*, Insersi A pada posisi 1521 (CTAAG → CATAAG) (Gambar 27) akan merubah sisi pengenalan dari enzim restriksi *DdeI* (C↓TNAG) dan insersi A pada posisi 1525 akan membentuk sisi pengenalan enzim restriksi *EcoM* (CCTNN↓NNNAGG) sehingga akan terpotong dengan enzim *EcoM*.

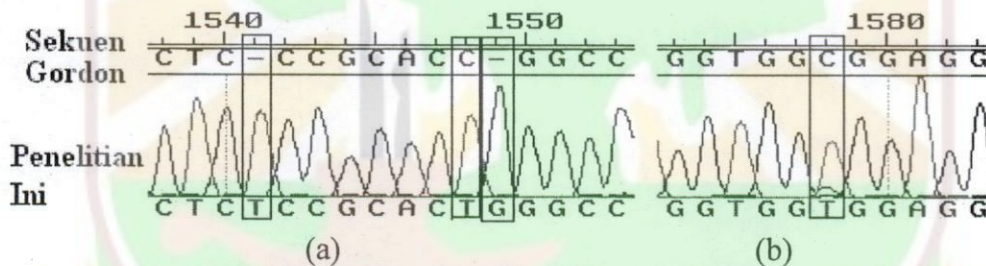
Insersi pada posisi 1539 (Gambar 27) akan merubah sisi pengenalan enzim restriksi *AluI*(AG↓CT), insersi A dapat dideteksi dengan enzim restriksi

*Bsm*NI(GCACT) sedangkan insersi C dapat dideteksi dengan enzim restriksi *Mnl*I(CCTC↓NNNNNNN↓).



Gambar 27. Insersi pada posisi 1508, 1521, 1525, 1539, 1541, mutasi G → T pada posisi 1524 dan mutasi G → C pada posisi 1537

Sedangkan insersi T pada posisi 1541 (Gambar 28) hanya bisa dideteksi dengan sekuensing karena tidak ada enzim restriksi yang memotong pada posisi ini, dan insersi G pada posisi 1549-1551 akan membentuk sisi pengenalan dari enzim restriksi *Fmu*I(GGNC↓C) sehingga akan terpotong oleh enzim restriksi *Fmu*I.



Gambar 28. Insersi T dan G pada posisi 1541 dan 1549, dan mutasi C → T pada posisi 1548 dan 1578.

Dari hasil sekuensing juga terungkap adanya 3 keragaman baru pada posisi 1482, 1525, dan 1578. Mutasi baru pada posisi 1525 (Gambar 27) hanya bisa dideteksi dengan sekuensing karena tidak ada enzim restriksi yang memotong pada posisi ini sedangkan mutasi baru (GTGG → GTAA) pada posisi 1482 akan membentuk sisi pengenalan enzim restriksi *M.ngob*IX (↓GTANNNNNCTG), dan transisi baru (C → T) pada posisi 1578 (Gambar 28(b)) dapat dideteksi dengan

enzim restriksi *Acil*(GGC↓G) karena transisii ini akan merubah sisi pengenalan dari enzim restriksi *Acil*.

Dari analisis sekuen fragmen GH4 Sapi Pesisir tidak ditemukan adanya keragaman pada posisi 1438 – 1439, yang mengungkapkan pada 345 bp fragmen ini tidak adanya keragaman sisi pemotong enzim *MspI*. Hasil penelitian ini bertentangan dengan hasil penelitian Cowan *et al.* (1989) pada sapi FH dimana mereka mendapatkan adanya keragaman pada posisi 1438 – 1439, akan tetapi hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Yao *et al.* (1996) pada sapi *Bos taurus*.

Ditemukan juga keragaman sisi pemotong enzim restriksi *MspI*(C↓CGG) pada posisi 1548 (Gambar 28a), fragmen sepanjang 345 bp ini akan terpotong menjadi dua fragmen yang panjangnya 59 dan 286 bp jika dipotong dengan enzim *MspI* dan jika ada keragaman sisi pemotong *MspI* selanjutnya fragmen 286 bp akan terpotong menjadi fragmen sepanjang 109 dan 177 bp. Jika dipotong dengan enzim *MspI* sekuen ini akan menghasilkan frekuensi alele *MspI*(-) dan *MspI*(+) berturut-turut 0,94 dan 0,06. Frekuensi alel ini sedikit lebih tinggi jika dibandingkan dengan penelitian Jakaria (2008) yang menggunakan PCR-RFLP yang melaporkan frekuensi alel *MspI*(-) dan *MspI*(+) berturut-turut 0.791 dan 0.209. Tingginya frekuensi alel *MspI*(-) mungkin karena berbedanya metodologi yang digunakan dan sampel yang lebih sedikit.

Keragaman sisi pemotong enzim *MspI*(C↓CGG) disebabkan transisi C → T pada posisi 1547 dan insersi G pada posisi 1548. Hasil penelitian ini berbeda dengan yang diperoleh oleh Hoj *et al.* (1993) yang melaporkan hilangnya sisi pemotong enzim *MspI* disebabkan oleh adanya insersi T pada posisi 1547 dan

transversi C → G pada posisi -837. Akan tetapi hasil penelitian ini sama dengan sekuen yang dilaporkan Woychik *et al.* (1982) dan Yao *et al.* (1996).

Keragaman pada posisi 1547, yang menimbulkan adanya sisi pemotong *MspI*, hasilnya berlawanan dengan frekuensi allele yang dilaporkan oleh beberapa peneliti pada *breed taurine* di Eropa Utara, negara-negara Mediterania, dan benua Amerika. Misalnya 0,26 pada sapi Holstein (Zhang *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 2005); 0,00 pada Hereford, 0,15 pada Jersey, 0,35 pada Limousine, 0,14 pada Angus; 0,13 pada Polish Black dan White (Dybus *et al.*, 2004); 0,05 pada Red Danish (Høj *et al.*, 1993); dan 0,50 pada breed asli Iran dan 0,45 pada Sapi Sarabi Iran (Zakizadeh *et al.*, 2006). Frekuensi allele *MspI* (-) pada penelitian ini sedikit lebih tinggi jika dibandingkan dengan frekuensi allele *MspI* (-) pada Sapi Sahiwal yaitu 0,86 (Mitra *et al.*, 1995); 0,82 pada Brazilian Nellore (Lagziel *et al.*, 2000). dan juga sedikit lebih tinggi dari penelitian Sodhi *et al.*, (2007) yang melaporkan frekuensi allele 0,83 pada sapi Zebu India (*Bos indicus*) dan 0,81 – 0,87 pada Zebu India (Pawar *et al.*, 2007); 0,82 – 0,85 pada Nellore Brazil (Unanian *et al.*, 2002).

Berdasarkan frekuensi allele *MspI* (-) ini Sapi Pesisir lebih dekat hubungannya dengan Sapi Zebu India (*Bos Indicus*). Tingginya frekuensi allele GH-*MspI* (-) allele pada Sapi Pesisir menggugurkan sebagian hypothesis yang dikemukakan oleh Lagziel and Soller (1999) dan Lagziel *et al.*, (2000) yang menyatakan makin jauh suatu daerah dari India maka makin rendah frekuensi allele GH-*MspI* (-) nya. Turunnya nilai frekuensi allele GH-*MspI* (-) hanya berlaku kearah Barat dari India, sedangkan untuk kearah Timur seperti Indonesia hipotesis ini sepertinya tidak berlaku.

4.5.2. Polimorfisme Daerah Exon 4 dan Sebagian Intron 4

Amplifikasi menggunakan pasangan primer GH5L dan GH5R menghasilkan fragmen sepanjang 366 bp pada daerah exon 4 dan sebagian intron 4. Menggunakan teknik pensejajaran dengan sekuen Gordon *et al.* (1983), sekuen Woichick *et al.* (1982), dan sekuen lainnya di *NCBI GenBank* menghasilkan taraf kesamaan antara 96 - 97 %, hal ini membuktikan bahwa sekuen yang teramplifikasi adalah benar sekuen dari gen hormon pertumbuhan.

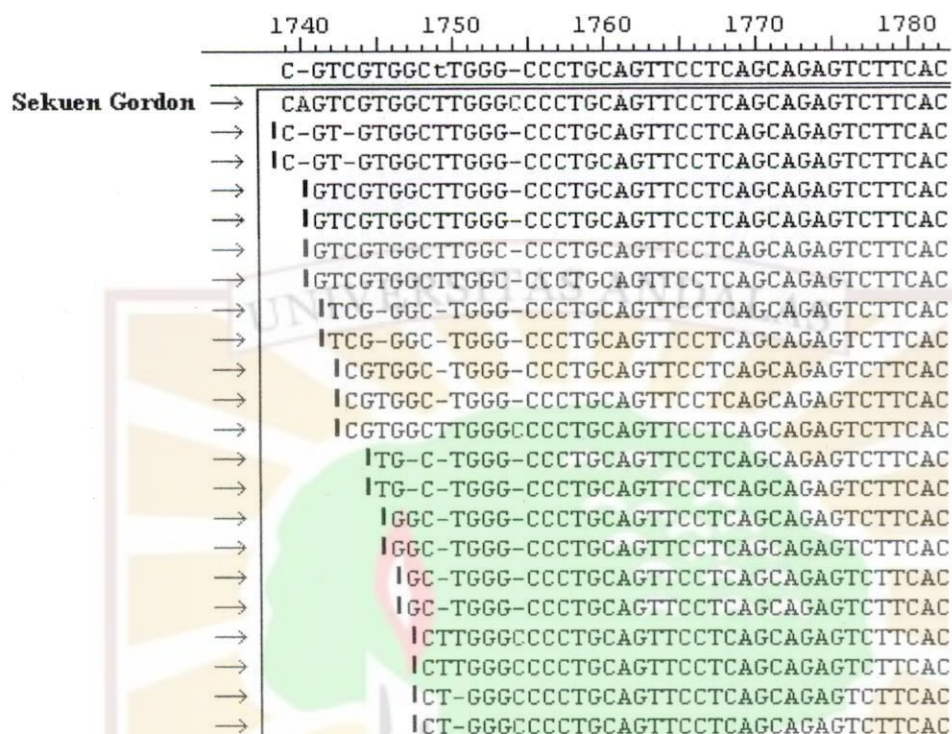
Menggunakan sekuen Gordon *et al.* (1983) sebagai dasar analisis (Lampiran 2) pada exon 4 dijumpai adanya 7 delesi dan 2 insersi sedangkan pada intron 4 dijumpai adanya 1 insersi dan 5 mutasi sebagaimana dapat dilihat pada (Tabel 4.3).

Tabel 4.3. Polimorfisme gene GH fragmen 5

No	Jumlah Sampel	Mutasi	Posisi Nukleotida	Frekuensi Alele
1	2	Delesi A	1740	1,00
2	10	Delesi C	1743	0,20
3	11	Delesi T	1745	0,18
4	17	Delesi G	1747	0,125
5	21	Delesi T	1749	0,43
6	21	Delesi T	1750	0,14
7	29	Delesi G	1753	0,07
8	29	Insersi C	1754	0,31
9	46	Insersi C	1789	0,03
10	53	Insersi C	1895	1,00
11	49	C → G	1915	0,51
12	49	G → A	1930	0,51
13	43	T → G	1947	1,00
14	48	T → C	1980	0,40
15	53	A → G	2025	0,26

Dari 7 delesi yang ditemukan, 5 delesi baru teridentifikasi dari sekuen fragmen ini pada Sapi Pesisir yaitu delesi C pada posisi 1743, delesi T pada posisi

1745, delesi G pada posisi 1747, delesi T pada pisisi 1749, delesi G pada posisi 1753, dan delesi C pada posisi 1754 (Gambar 29).



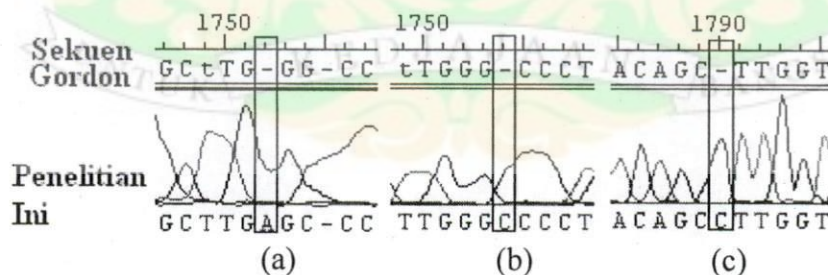
Gambar 29. Delesi dan insersi pada posisi 1740, 1743, 1745, 1747, 1749, 1753, dan 1754

Lima mutasi baru juga terdeteksi pada fragmen ini yaitu transversi C → G pada posisi 1915, transisi G → A pada posisi 1930, transversi T → G pada posisi 1947, transisi T → C pada posisi 1980, dan transisi A → G pada posisi 2025 dengan frekuensi alel berturut-turut 0,51; 0,51; 1,00; 0,40; dan 0,26.

Kecuali insersi C pada posisi 1895 dan transversi T → G pada posisi 1947, keragaman lainnya bersifat polimorfik akan tetapi setelah diuji dengan uji *chi-square* menunjukkan tidak adanya hubungan yang nyata antara dua kelompok bobot badan dengan keragaman sekuen (Lampiran 8). Hal ini mungkin disebabkan karena bobot badan dipengaruhi oleh banyak gen seperti GHR, IGF1, tidak hanya oleh gen hormon pertumbuhan (Ge *et al.*, 2003). Sebagaimana

diketahui bahwa penampilan atau fenotip dipengaruhi oleh faktor genetik dan faktor lingkungan, oleh karena itu, potensi genetik suatu sifat ternak hanya dapat diketahui apabila faktor lingkungan diseragamkan (Warwick *et al.*, 1990) sehingga fenotip yang ditampilkan merupakan cerminan dari efek factor genetik semata. Tidak seragam sistim pemeliharaan antar peternak diduga sebagai penyebab lain tidak adanya hubungan antara keragaman gen GH dengan dua kelompok berat badan sapi. Karena ke 13 keragaman sekuen ini bersifat polimorfik, keragaman ini berpotensi untuk dijadikan marker genetik dan dapat diuji lebih lanjut untuk dapat dijadikan kandidat marker.

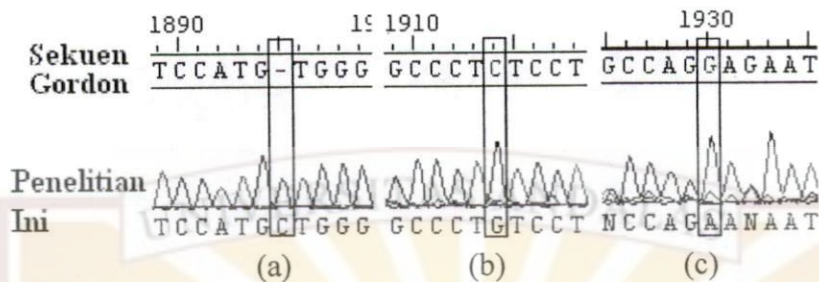
Inseri A pada posisi 1752 (Gambar 30a) akan merubah sisi pemotong enzim restriksi *PpeI* (GGGCC↓C) atau enzim restriksi *PspOMI*(G↓GGCCC) atau enzim restriksi *EciEI* (GGGCCC) sedangkan delesi G pada posisi 1753 (Gambar 30b) akan merubah sisi pemotong enzim restriksi *PpeI* (GGGCC↓C) atau enzim restriksi *PspOMI*(G↓GGCCC) atau enzim restriksi *EciEI* (↓GGGCCC). Inseri pada posisi 1790 (Gambar 30c) merubah sekuen dari AGCT menjadi AGCCT sehingga bisa dideteksi dengan enzim restriksi *AluI*(AG↓CT) atau enzim restriksi *BsaII*(↓AGCT).



Gambar 30. Inseri A pada posisi 1752 dan inseri C pada posisi 1754 dan 1790

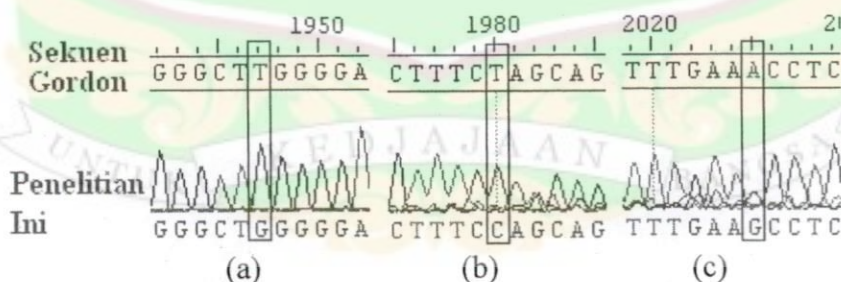
Tranversi C → G pada posisi 1914 (Gambar 31b) akan merubah sisi pemotong dari enzim restriksi *MnII*(CCTCNNNNNNN↓) sehingga jika terjadi

mutasi sekuen tidak akan terpotong dengan enzim restriksi *MnII*. Sedangkan transisi $G \rightarrow A$ pada posisi 1930 (Gambar 31c) akan merubah sisi pemotong enzim restriksi *NcuI*(↓GAAGA).



Gambar 31. Insersi C, mutasi $C \rightarrow G$, dan mutasi $G \rightarrow A$ pada posisi 1895, 1914, dan 1930

Transversi $T \rightarrow G$ pada posisi 1947 (Gambar 32a) juga terdapat pada sapi *Bos taurus* kode akses AF117348.1. Tranversi ini hanya bisa dideteksi dengan sekuensing dan transisi $T \rightarrow C$ pada posisi 1980 akan merubah sisi pemotong enzim restriksi *BfaI*(C↓TAG) dan enzim restriksi *MjaI*(↓CTAG) sehingga jika terjadi mutasi sekuen tidak akan terpotong dengan enzim restriksi *BfaI* atau enzim restriksi *MjaI*. Sedangkan transisi $A \rightarrow G$ pada posisi 2025 (Gambar 32c) hanya bisa dideteksi dengan sekuensing.



Gambar 32. Mutasi $T \rightarrow G$, $T \rightarrow C$, dan $A \rightarrow G$ pada posisi 1947, 1980, dan 2025

4.5.3. Polimorfisme Daerah Exon 5.

Amplifikasi menggunakan pasangan primer GH6L dan GH6R menghasilkan fragmen sepanjang 405 bp pada daerah Exon 5. Menggunakan sekuen Gordon *et al.*, (1983) sebagai dasar analisis (Lampiran 3) pada fragmen GH5 dijumpai adanya 3 insersi, dan 2 mutasi (Tabel 4.4).

Tabel 4.4. Polymorfisme gene GH fragmen 6

No	N.	Mutasi	Posisi	Frekuensi Allel
1	57	C → T	2230	0,47
2	60	A → C	2291	0,72
3	56	Insersi C	2379	0,05
4	56	Insersi C	2386	0,05
5	56	Insersi G	2393	0,05

Dari hasil analisis ditemukan 3 insersi baru pada fragmen ini yaitu insersi C pada posisi 2379 dan 2386, dan insersi G pada posisi 2393. Sedangkan transversi A → C pada posisi 2291 telah pernah dilaporkan oleh Yao *et al.* (1986) yang bisa dideteksi oleh enzim restriksi *DdeI*. Transisi C → T pada posisi 2230 sama dengan titik mutasi yang ditemukan pada sapi Zebu di China (kode akses EU344985) dan sapi Sahiwal (kode akses EF451795) dan Sapi Aceh (Sari, 2011).

Dari analisis sekuen Sapi Pesisir tidak ditemukan adanya keragaman pada posisi 2141. Polimorfisme pada posisi 2141 dikenal juga dengan *AluI*-RFLP yang pertama kali dilaporkan oleh Zang *et al.* (1992,1993) dan Lucy *et al.* (1993) dan kemudian oleh Yao *et al.* (1996). Keragaman ini disebabkan terjadinya perubahan sekuen C → G, sehingga terjadi perubahan CTG menjadi GTG (Leusine menjadi valine), sehingga dapat dideteksi dengan enzim restriksi *AluI*. Hasil ini mengungkapkan pada sepanjang 404 bp fragmen ini tidak adanya keragaman sisi

pemotong enzim restriksi *AluI*. Hasil penelitian ini hampir sama dengan penelitian Jakaria (2008) yang mendapatkan frekuensi alel (L) 0,99 dan alel V 0,01 pada sapi Pesisir dan juga sejalan dengan penelitian Sari (2011) pada sapi Aceh yang hanya mendapatkan genotip L pada sapi Aceh. Perbedaan hasil yang diperoleh dibandingkan dengan penelitian Jakaria (2008) mungkin disebabkan oleh jumlah sampel yang lebih sedikit dan perbedaan metoda yang digunakan.

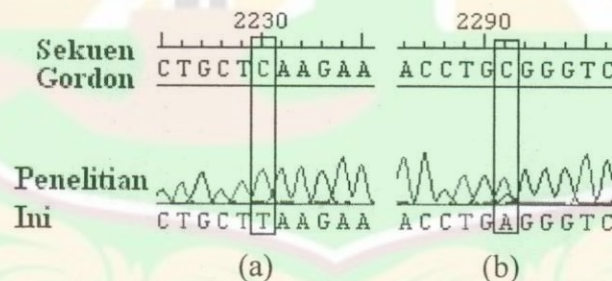
Frekuensi alel (L) penelitian ini sama dengan sapi *Brown Swiss* (Lucy *et al.*, 1993), sapi Gyr, sapi Guzera, sapi Nelore (Kemenes *et al.*, 1999), Sapi Gyr Brazilia (de Mattos *et al.*, 2004), sapi Iranian Sistani & Dashtyari (Masoudi *et al.*, 2002). Frekuensi alel GH(L) dan GH(V) pada beberapa breed sapi dari para peneliti lain dapat dilihat pada Table 4.6 dimana terlihat Sapi Holstein, Brown Swiss dan Guernsey mempunyai frekuensi alel L yang tinggi sedangkan Sapi Jersey dan Airshire mempunyai frekuensi alel V yang tinggi.

Semua polimorfisme pada exon 5 ini bersifat polimorfik karena frekuensi allelnya lebih besar dari 0,05, akan tetapi setelah diuji dengan χ^2 diperoleh hasil yang sama dengan analisis pada fragmen GH4 dan GH5 dimana tidak didapat hubungan nyata antara keragaman ini dengan dua kelompok bobot badan (Lampiran 9) yang disebabkan karena bobot badan dipengaruhi oleh banyak gen seperti GHR, IGF1, tidak hanya oleh gen hormon pertumbuhan (Ge *et al.*, 2003) dan juga karena faktor lingkungan/pemeliharaan tidak sama antar peternak, sebagaimana diketahui potensi genetik suatu sifat ternak hanya dapat diketahui apabila faktor lingkungan ditiadakan/diseragamkan (Warwick *et al.*, 1990) sehingga fenotip yang ditampilkan merupakan cerminan dari efek factor genetik semata. Tidak adanya hubungan antara keragaman gen GH dengan dua kelompok

semata. Tidak adanya hubungan antara keragaman gen GH dengan dua kelompok berat badan sapi pesisir mungkin juga karena jumlah sampel yang digunakan juga terbatas.

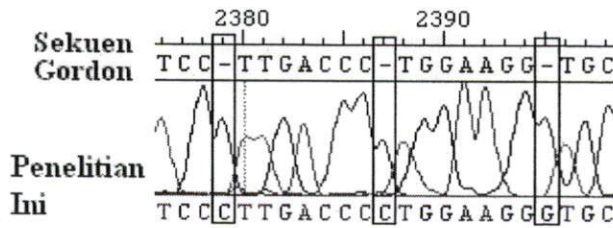
Karena ke 5 keragaman sekuen ini bersifat polimorfik, maka keragaman ini berpotensi untuk dijadikan marker genetik dan dapat diuji lebih lanjut untuk dapat dijadikan kandidat marker.

Transisi C → T pada posisi 2230 (Gambar 33a) akan membentuk sisi pengenal enzim restriksi *BsaFI*(↓CTTAAG) atau enzim restriksi *Bst98I*(C↓TTAAG) sehingga jika terjadi mutasi sekuen akan terpotong dengan enzim restriksi *BsaFI* atau *Bst98I*. Transversi A → C pada posisi 2291 (Gambar 33b) juga pernah dilaporkan oleh Yao *et al.* (1996), transversi ini akan merubah kodon AGG menjadi CGG. Keragaman ini menyebabkan terjadi perubahan sisi pemotong enzim restriksi *DdeI* (C↓TNAG).



Gambar 33. Mutasi C → T dan C → A pada posisi 2230 dan 2291

Inseri C pada posisi 2379 (Gambar 34) hanya dapat dideteksi dengan sekuensing sedangkan inseri C pada posisi 2386 akan merubah sisi pemotong enzim restriksi *HgiEI*(↓ACNNNNNNGGT), dan inseri G pada posisi 2393 akan merubah sisi pemotong enzim restriksi *ScrFI*(GGN↓NCC) atau enzim *HgiI*(G↓GYRCC) atau enzim *Eco50I*(↓GGYRCC)



Gambar 34. Insersi pada posisi 2379, 2386, dan 2393

4.5.4. Polimorfisme Daerah Ujung Gen GH.

Amplifikasi PCR menggunakan pasangan primer GH7L dan GH7R menghasilkan fragmen sepanjang 455 bp pada daerah ujung gen GH. Dengan teknik pensejajaran diperoleh tingkat kesamaan sekuen dengan sekuen Gordon *et al.* (1983) dan Woichick *et al.* (1990) sebesar 96 - 97 % yang membuktikan sekuen yang teramplifikasi adalah benar sekuen dari gen hormon pertumbuhan.

Menggunakan sekuen Gordon *et al.* (1983) sebagai dasar analisis (Lampiran 4) pada daerah ujung dijumpai adanya 5 delesi baru (Tabel 4.5), yaitu delesi T pada posisi 2432, delesi G pada posisi 2433, delesi A pada posisi 2435, delesi T pada posisi 2731, dan delesi C pada posisi 2732 dengan frekuensi alel berturut-turut 1,00; 0,15; 0,20; 0,04; dan 0,05.

Menggunakan sekuen Gordon *et al.* (1983) sebagai dasar analisis ditemukan 10 substitusi baru yaitu transisi A → G pada posisi 2429, transisi T → C pada posisi 2436, transversi G → T pada posisi 2537 dan posisi 2567, transversi C → G pada posisi 2639, transisi T → C pada posisi 2647, transversi A → G pada posisi 2703, transversi C → T pada posisi 2710 dan 2732, dan transisi G → A pada posisi 2813. Dengan frekuensi alel berturut-turut 0,93; 0,35; 0,62; 0,96; 1,00; 0,63; 0,47; 0,65; 0,92; dan 1,00. Juga ditemukan insersi T pada posisi 2459 dengan frekuensi alel 0,02

Tabel 4.5. Polymorfisme gene GH fragmen 7

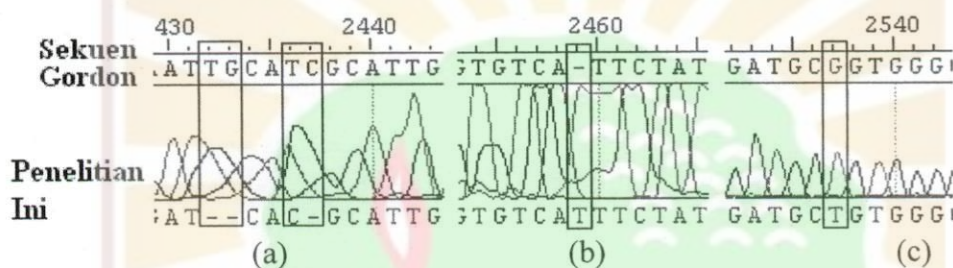
N0	N	Mutasi	Posisi	Frekuensi Allele
1	12	A → G	2429	0,93
2	15	Delesi T	2432	1,00
3	20	Delesi G	2433	0,15
4	25	Delesi A	2435	0,20
5	29	T → C	2436	0,35
6	58	Inseri T	2459	0,02
7	45	G → T	2537	0,62
8	52	G → T	2567	0,96
9	52	C → G	2639	1,00
10	41	T → C	2647	0,63
11	49	A → G	2703	0,47
12	51	C → T	2710	0,65
13	50	Delesi T	2731	0,04
14	40	C → T	2732	0,92
15	40	Delesi C	2732	0,05
16	30	G → A	2813	1,00

Dari 16 polimorfisme pada daerah ujung gen GH pada Sapi Pesisir 11 diantaranya bersifat polimorfik dan yang lainnya bersifat monomorfik. Seperti juga pada fragmen sebelumnya, setelah dianalisis dengan uji χ^2 tidak ditemukan ada hubungannya dengan dua kelompok berat badan (Lampiran 10). Hal ini mungkin disebabkan karena bobot badan dipengaruhi oleh banyak gen seperti GHR, IGF1, tidak hanya oleh gen hormon pertumbuhan (Ge *et al.*, 2003) dan tidak seragam sistem pemeliharaan antar peternak dan terbatasnya sampel diduga juga sebagai penyebab tidak adanya hubungan antara keragaman gen GH dengan dua kelompok berat badan sapi pesisir.

Karena ke 8 keragaman sekuen ini bersifat polimorfik, keragaman ini berpotensi untuk dijadikan marker genetik dan dapat diuji lebih lanjut untuk dapat dijadikan kandidat marker.

Transisi A → G pada posisi 2429 akan merubah sisi pengenal enzim restriksi *TseCI*(↓AATT) dan delesi pada posisi 2432 dan 2433 akan merubah sisi pengenal dari enzim restriksi *CviRI*(TG↓CA) sehingga jika terjadi delesi sekuen tidak akan terpotong dengan enzim *CviRI*

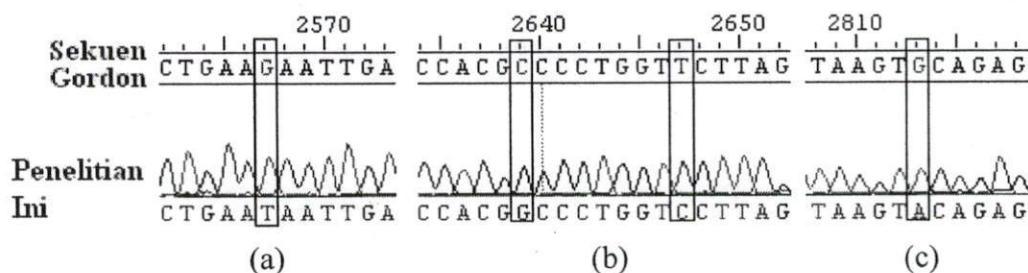
Transisi T → C pada posisi 2436 (Gambar 35a) membentuk sisi pengenal enzim restriksi *BsmNI*(GCACT) atau *BscAI*(GCACTNNNN↓NN) atau *BspST5I*(GCACTNNNNN↓NNNN).



Gambar 35. Keragaman pada posisi 2432,2433, 2436, 2437, 2459, dan 2537

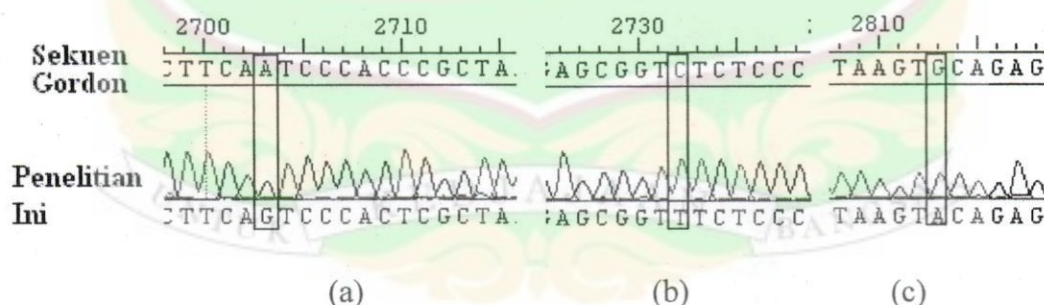
Inseri T pada posisi 2459 (Gambar 35b) hanya bisa dideteksi dengan sekuensing karena tidak ada enzim spesifik yang memotong pada posisi ini. Transversi G → T pada posisi 2537 (Gambar 35b) juga hanya bisa dideteksi dengan sekuensing.

Transversi G → T pada posisi 2567 (Gambar 36a) juga pernah dilaporkan oleh Lagziel *et al.*, (1999), mutasi ini akan merubah sisi pemotong enzim restriksi *NcuI*(↓GAAGA) sehingga jika terjadi mutasi, sekuen tidak akan terpotong dengan enzim *NcuI*. Transversi C → G pada posisi 2639 (Gambar 36b) akan membentuk sisi pengenal enzim restriksi *Eco47I*(GG↓WCC) atau *HaeIII*(GG↓CC) sehingga jika terjadi mutasi sekuen akan terpotong oleh enzim *Eco47I* atau *HaeIII*. Transisi T → C pada posisi 2647 (Gambar 36c) akan membentuk sisi pengenal enzim *AvaII*(G↓GWCC) sehingga jika terjadi mutasi sekuen akan terpotong jika di destriksi dengan enzim *AvaII*.



Gambar 36. Keragaman pada posisi 2567, 2639, 2647, dan 2813

Transisi $C \rightarrow T$ pada posisi 2710 (Gambar 37a) akan merubah sisi pemotong enzim restriksi *AciI*($C\downarrow CCG$) sehingga jika tidak ada mutasi sekuen akan terpotong jika direstriksi dengan enzim *AciI*. Delesi T pada posisi 2731 (GTCTC \rightarrow GCTC) akan merubah sisi pemotong enzim restriksi *BscqII*($\downarrow GTCTC$) dan transisi $C \rightarrow T$ pada posisi 2732 (Gambar 37b) akan merubah sisi pemotong enzim *Eco31I*(GGTCTCN \downarrow NNNN) dan transversi $G \rightarrow C$ pada posisi 2768 akan merubah sisi pemotong Enzim *BfaI*($C\downarrow TAG$) sehingga jika terjadi mutasi sekuen tidak akan terpotong jika didestriksi dengan enzim *BfaI*. Demikian juga transisi $G \rightarrow A$ pada posisi 2813 (Gambar 37c) akan merubah sisi pemotong dari enzim restriksi *CviRI*(TG \downarrow CA).



Gambar 37. Keragaman pada posisi 2703, 2710, 2732, dan 2813

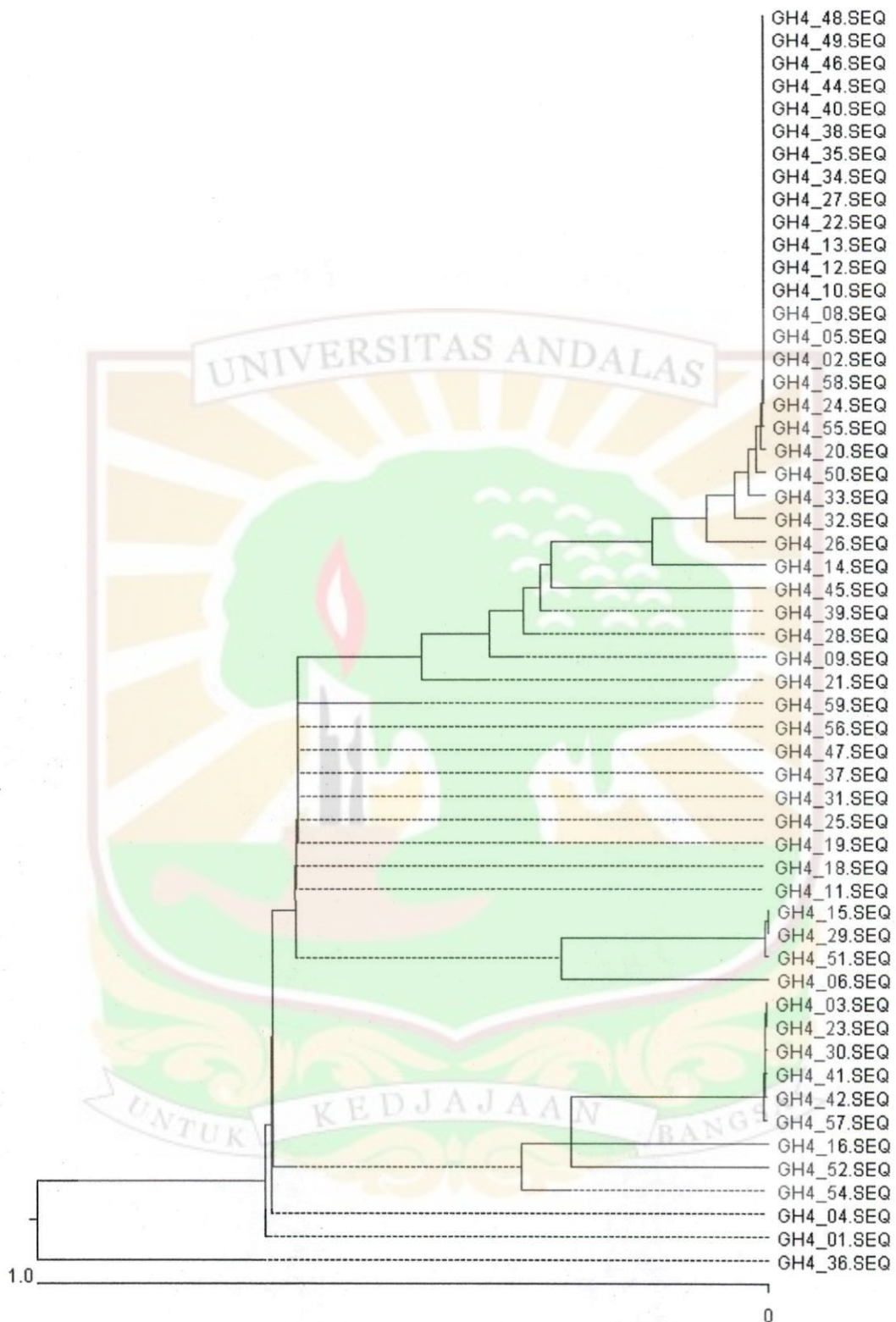
Berdasarkan keragaman pada fragmen GH4 sampai dengan GH7 daerah-daerah conserved berada pada daerah 1791 – 1903, 1981 – 2153, 2156 - 2229,

2568 – 2646, 2648 – 2702, dan 2733 – 2850 karena pada daerah tersebut tidak ditemui adanya keragaman sekuen.

Jarak genetik antar sampel dapat dilihat dengan menggunakan dendogram atau diagram pohon. Pada analisis dendogram ini angka nol pada dendogram menunjukkan anggota kelompok mempunyai kemiripan sempurna (jarak genetik nol), sedangkan semakin besar berarti jarak kemiripannya semakin jauh.

Dendogram sampel pada fragmen GH4 dapat dilihat pada gambar 38. Pada jarak genetik 0 atau kemiripan 100% ada 2 kelompok sampel, kelompok pertama terdiri atas 20 sampel, dan kelompok kedua 6 sampel. Pada kelompok pertama 10 diantaranya termasuk kelompok sampel berat badan rendah dan 10 sampel termasuk kelompok berat badan tinggi. Pada kelompok kedua 3 diantaranya termasuk kelompok berat badan rendah dan 3 termasuk kelompok berat badan tinggi. Pada jarak genetik 0,65 ada satu kelompok sampel yang terdiri atas 9 sampel, 4 diantaranya termasuk kelompok sampel dengan berat badan rendah dan 5 diantaranya termasuk kelompok berat badan tinggi.

Pada jarak genetik 0 - 0,70 sampel bisa dikelompokkan atas dua kelompok besar, kelompok pertama terdiri atas 43 sampel dan kelompok kedua 11 sampel, pada kelompok pertama 19 sampel diantaranya termasuk kelompok berat rendah dan 24 sampel termasuk kelompok badan tinggi. Berdasarkan hasil ini terlihat dendrogram tidak berhasil mengelompokkan sampel kedalam dua kelompok berat badan (kelompok sampel berat badan rendah dan kelompok sampel dengan berat badan tinggi) yang menunjukkan tidak adanya hubungan antara keragaman gen GH pada fragmen GH4 dengan kedua kelompok berat badan.



Keterangan : Sampel GH4_01 s/d GH4_30 kelompok berat badan rendah dan GH4_31 s/d GH4_59 Kelompok berat badan tinggi

Gambar 38. Dendrogram fragmen GH4

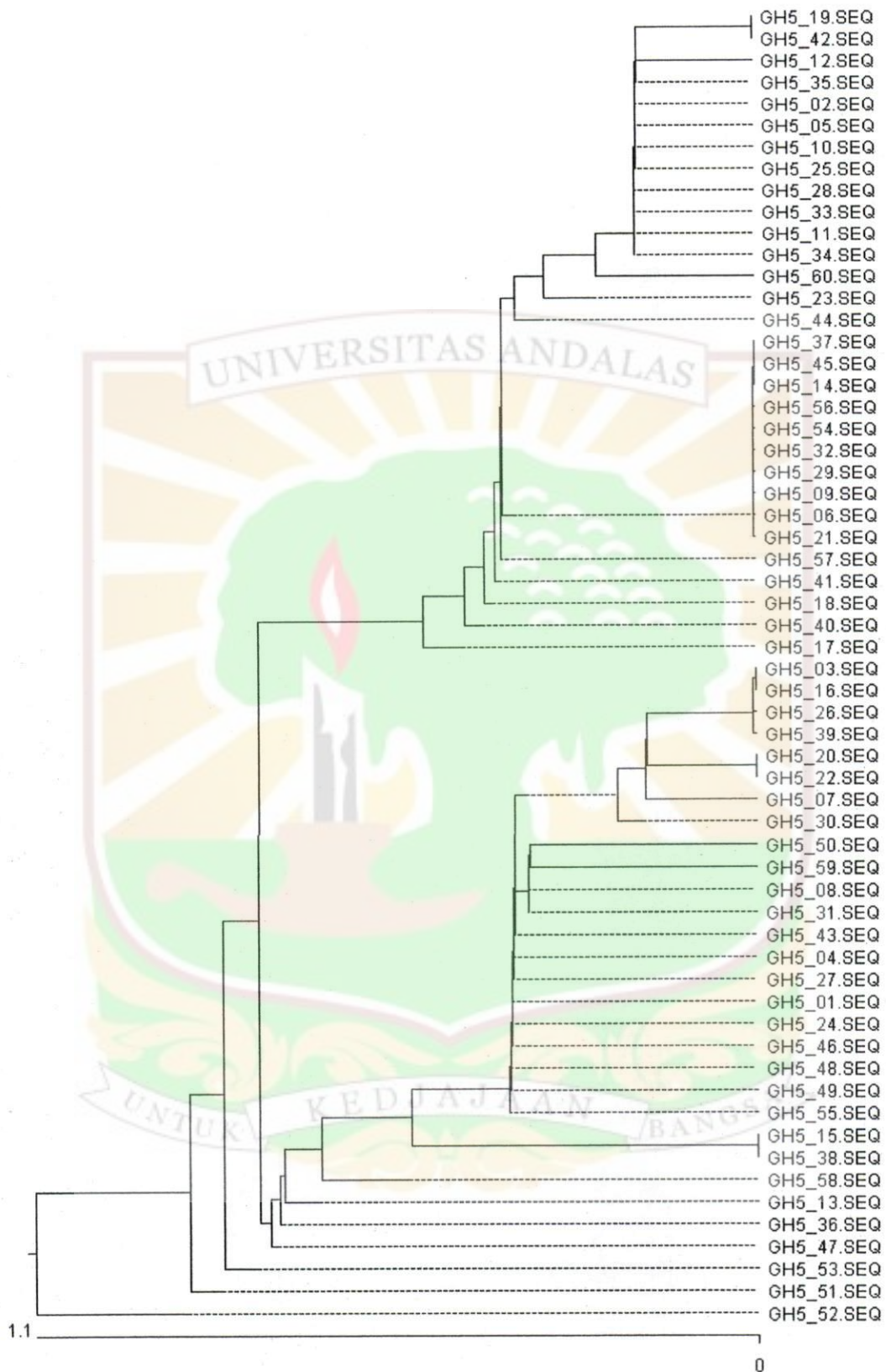
Hasil dendrogram yang digunakan untuk pengelompokan individu pada fragmen GH5 ditampilkan pada Gambar 39. Pada jarak genetik 0 (kemiripan 100%) ada suatu kelompok sampel yang terdiri atas 10 sampel, 5 diantaranya termasuk kelompok sampel berat badan rendah dan 5 termasuk kelompok berat badan tinggi.

Pada jarak genetik 0,2 ada suatu kelompok sampel yang terdiri atas 10 sampel, 8 diantaranya termasuk kedalam kelompok berat badan rendah dan 2 diantaranya termasuk kelompok berat badan tinggi. Pada jarak genetik 0,4 ada suatu kelompok sampel yang terdiri atas 13 sampel, 5 diantaranya termasuk kedalam sampel kelompok berat badan rendah dan 8 diantaranya termasuk kelompok berat badan tinggi.

Pada jarak genetik 0 - 0,80 sampel bisa dikelompokkan atas dua kelompok besar, kelompok pertama terdiri atas 30 sampel dan kelompok kedua 27 sampel, pada kelompok pertama 17 sampel diantaranya termasuk kelompok berat rendah dan 13 sampel termasuk kelompok badan tinggi. Pada kelompok kedua 14 sampel diantaranya termasuk kelompok berat rendah dan 13 sampel termasuk kelompok badan tinggi.

Berdasarkan hasil ini terlihat dendrogram seperti juga pada fragmen GH4 tidak berhasil mengelompokkan sampel kedalam dua kelompok berat badan (kelompok sampel berat badan rendah dan kelompok sampel dengan berat badan tinggi) yang menunjukkan tidak adanya hubungan antara keragaman gen GH pada fragmen GH5 dengan kedua kelompok berat badan.

Hasil pengelompokan sampel pada fragmen GH6 dengan dendrogram dapat dilihat pada Gambar 40. Pada jarak genetik 0 (kemiripan 100%) ada 3 kelompok

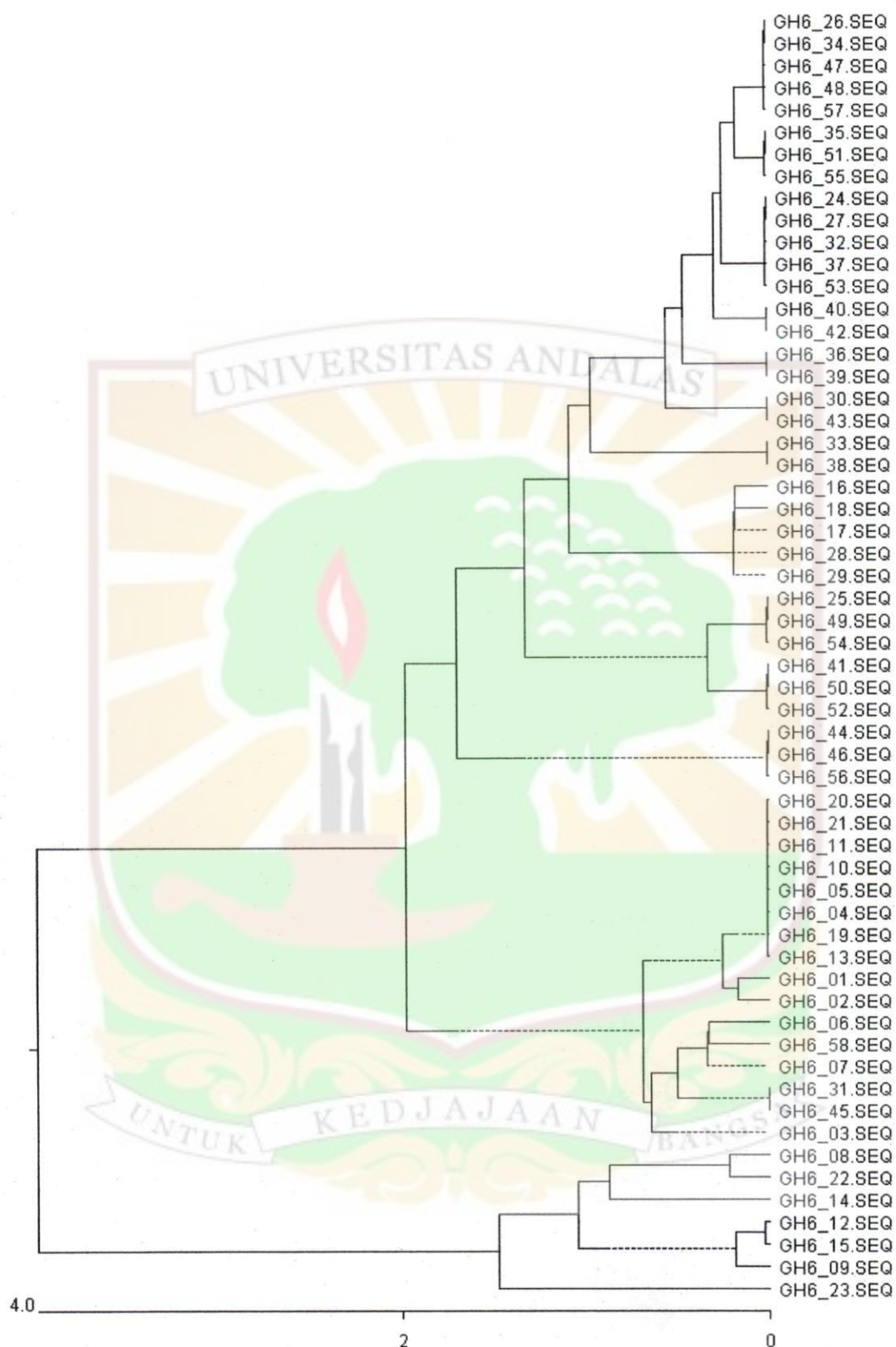


Keterangan : Sampel GH5_01 s/d GH5_30 kelompok berat badan rendah dan
GH5_31 s/d GH5_60 Kelompok berat badan tinggi

Gambar 39. Dendrogram fragmen GH5

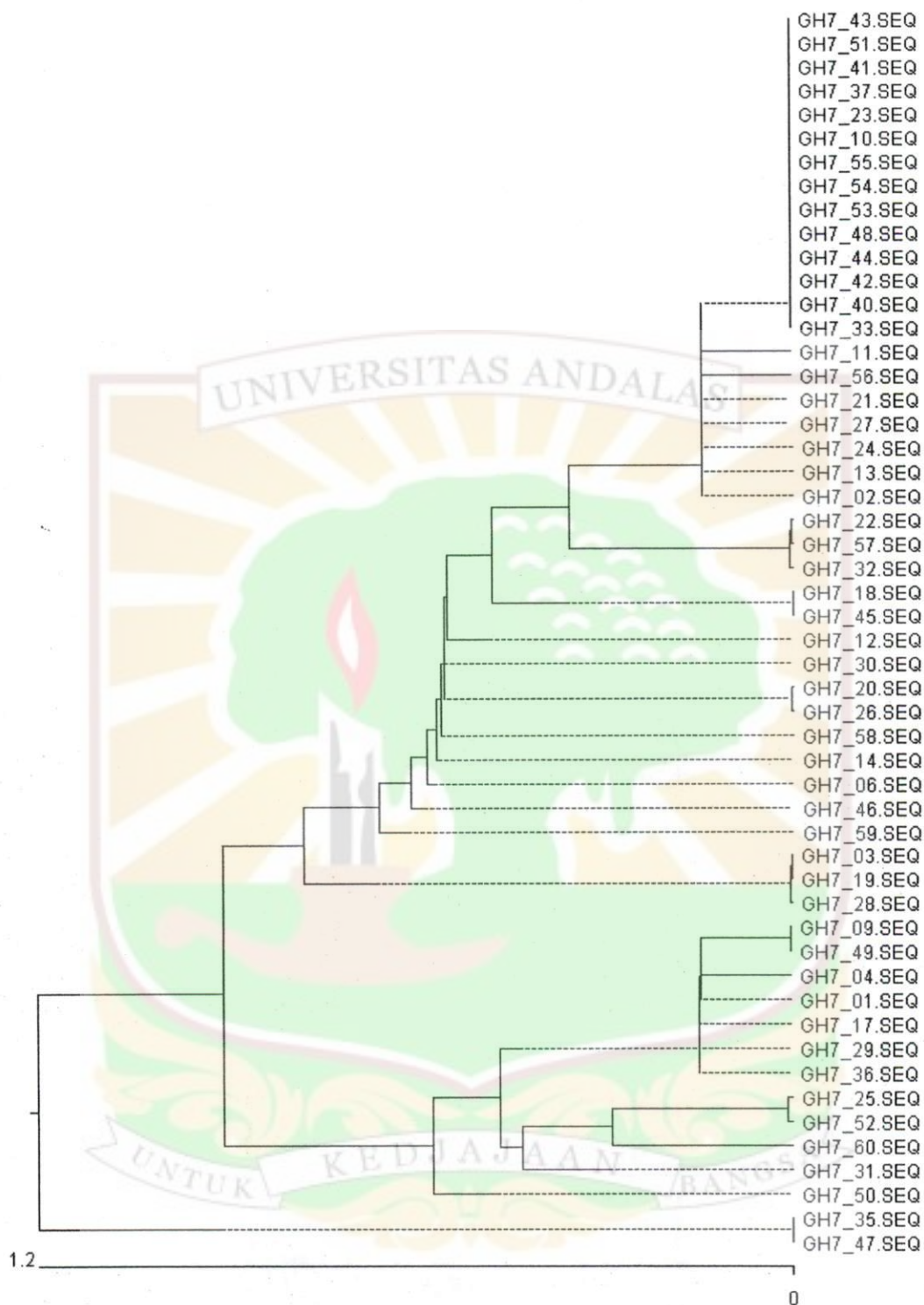
sampel yang pertama terdiri atas 10 sampel, kelompok kedua terdiri atas 5 sampel dan kelompok ketiga terdiri atas 8 sampel. Pada kelompok pertama satu sampel termasuk kelompok sampel berat badan rendah dan 4 sampel termasuk kelompok berat badan tinggi, pada kelompok kedua 2 diantaranya termasuk kelompok berat rendah dan 3 sampel termasuk kepada kelompok berat badan tinggi dan kelompok ketiga semuanya termasuk kelompok berat badan rendah. Dan pada jarak genetik 0 – 2,0 sampel terbagi atas dua kelompok besar, kelompok pertama terdiri atas 51 sampel dan kelompok kedua atas 7 sampel, pada kelompok pertama 23 diantaranya termasuk sampel kelompok berat rendah dan 28 diantaranya termasuk pada kelompok sampel berat badan tinggi, dan pada kelompok kedua semuanya termasuk kedalam kelompok sampel berat badan rendah. Seperti halnya dendogram sampel pada fragmen GH4 dan GH5, secara umum dendogram sampel pada fragmen GH6 belum berhasil mengelompokkan sampel kedalam dua kelompok berat badan (kelompok sampel berat badan rendah dan kelompok sampel dengan berat badan tinggi) yang menunjukkan tidak adanya hubungan antara keragaman gen GH pada fragmen GH6 dengan kedua kelompok berat badan.

Hasil pengelompokkan sampel pada fragmen GH7 dengan dendogram dapat dilihat pada Gambar 41. Pada jarak genetik 0 (kemiripan 100%) ada suatu kelompok sampel yang terdiri atas 14 sampel, satu diantaranya termasuk kedalam kelompok sampel berat rendah dan 13 termasuk kelompok berat badan tinggi. Pada jarak genetik 0,15 ada dua kelompok sampel, yang pertama terdiri atas 7 sampel dan yang kedua terdiri atas 5 sampel, pada kelompok pertama 6 termasuk kelompok berat badan rendah dan 1 termasuk kelompok berat badan tinggi, pada



Keterangan : Sampel GH6_01 s/d GH6_30 kelompok berat badan rendah dan
GH6_31 s/d GH6_58 Kelompok berat badan tinggi

Gambar 40. Dendrogram fragmen GH6



Keterangan : Sampel GH5_01 s/d GH5_30 kelompok berat badan rendah dan GH5_31 s/d GH5_59 Kelompok berat badan tinggi

Gambar 41. Dendrogram fragmen GH7

kelompok yang kedua 4 termasuk kelompok berat rendah dan 1 termasuk kelompok berat tinggi.

Pada jarak genetik 0 – 0,9 sampel terbagi atas dua kelompok besar, kelompok pertama terdiri atas 38 sampel dan kelompok kedua atas 12 sampel, pada kelompok pertama 19 diantaranya termasuk kelompok berat rendah dan 19 diantaranya termasuk pada kelompok berat badan tinggi, dan pada kelompok kedua 6 diantaranya termasuk pada kelompok berat badan rendah dan 6 termasuk kepada kelompok berat badan tinggi. Seperti juga halnya dendogram sampel pada fragmen GH4, GH5, dan GH6 secara umum dendogram sampel pada fragmen GH7 belum berhasil mengelompokkan sampel kedalam dua kelompok berat badan (kelompok sampel berat badan rendah dan kelompok sampel dengan berat badan tinggi) yang menunjukkan tidak adanya hubungan antara keragaman gen GH pada fragmen GH7 dengan kedua kelompok berat badan.

4.6. Kesamaan Sekuen dengan Sekuen Lainnya

Amplifikasi fragmen GH4 menggunakan pasangan primer GH4L dan GH4R setelah disekuensing menghasilkan sekuen sepanjang 214 bp yang meliputi daerah exon 3 dan sebagian intron 4 sebagai berikut:

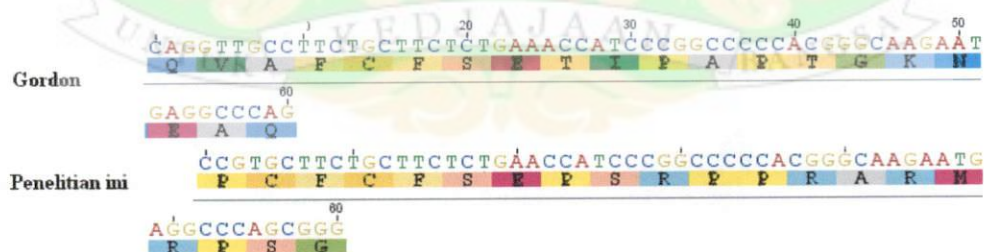
→ Forward

```
CCGTGCTTCTGCTTCTCTGAACCATCCCGGCCCCACGGGCAAGAATG  
AGGCCCAGCAGAAATCAGTGAGTGRC AACCTCGGACCGAGGAGCAGG  
GGACCTCCTTCATCCTAAGTAGGCTGCCCCAGCTCTCCGCACTGGGCCT  
GGGGCGGCCTTCTCCCCGAGGTGGCGGAGGTTGTTGGATGGCAGTGGA  
GGATGATGGTGGGCGGTGGTGGC
```

Hasil analisis homologi fragmen GH4, menunjukkan sekuen memiliki nilai kesamaan (*similarity*) yang tinggi dengan sekuens gen *bovine growth hormone* (bGH) yang terdapat di *NCBI GenBank* (Gordon *et al.*, 1983) nomor

akses M57764.1 dan sekuens Woychick *et al.* (1982). Kesamaan sekuens fragmen GH4 yang tinggi dengan sekuens yang ada memberikan keyakinan bahwa fragmen gen GH4 yang diamplifikasi memang merupakan fragmen dari gen GH. Persentase kesamaan fragmen GH4 ini dengan sekuens Gordon *et al.* (1983) dan sekuens Woychick *et al.* (1982) adalah 96%. Sekuen juga diuji kesamaannya dengan sekuens gen GH lainnya yang terdapat di *NCBI GenBank*. Hasil memperlihatkan sekuens mempunyai kesamaan yang tinggi (96 % – 99 %) dengan sekuens yang terdapat pada *NCBI GenBank*.

Jika sekuens pada daerah exon 3 ini ditransformasikan ke asam amino maka akan menghasilkan struktur asam amino yang berbeda dibandingkan dengan struktur asam amino sekuens Gordon *et al.* (1983) dan Woychick *et al.* (1982). Delesi pada posisi 1408, 1410, 1412, dan 1414 akan menghilangkan codon CAG dan merubah codon GTT dan GCC menjadi CCG dan TGC, yang mengakibatkan hilangnya asam amino Gln dan berubahnya asam amino Val dan Ala menjadi Pro dan Cys. Sedangkan delesi A pada posisi 1429 akan merubah codon ACC, ATC, CCG, GCC, CCC, ACG, GGC, AAG, AAT, GAG, dan GCC berturut-turut menjadi codon CCA, TCC, CGG, CCC, CCA, CGG, GCA, AGA, ATG, AGG, CCC, dan AGC. Perbandingan asam amino dengan Gordon *et al.* (1983) dengan menggunakan *software Geneious Basic 5.6.3*. dapat dilihat pada Gambar 42.



Gambar 42. Perbandingan urutan asam amino pada daerah exon 3 dengan Gordon *et al.* (1983)

Amplifikasi fragmen GH5 menggunakan pasangan primer GH5L dan GH5R setelah disekuensing menghasilkan sekuen sepanjang 330 bp sebagai berikut:

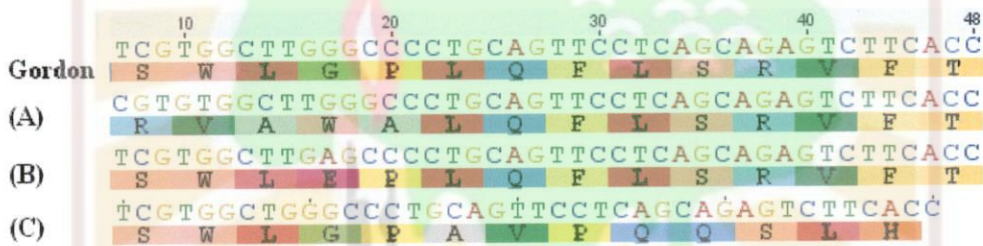
➔ Forward

CGTCGKGGCTTGGGCCCTGCAGTTCCTCAGCAGAGTCTTCACCAACAGCTTGGTG
TTTGGCACCTCGGACCGTGTCTATGAGAAGCTGAAGGACCTGGAGGAAGGCATCC
TGGCCCTGATGCGGGTGGGGATGGCGTTGTGGGTCCCTTCCATGCTGGGGGCCAT
GCCCCCCTSTCCTGGCTTAGCCAGRAGAATGCACGTGGGCTGGGGGAGACAGAT
CCCTGCTCTCTCCCTCTTTCYAGCAGTCCAGCCTTGACCCAGGGGAAACCTTTTC
CCCTTTTGAARCCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTARGGGAGGGTGGAAA

Hasil analisis homologi fragmen daerah exon 4 hasil amplifikasi menggunakan pasangan primer GH5L dan GH5R, menunjukkan sekuen memiliki nilai kesamaan (*similarity*) yang tinggi dengan sekuens gen *bovine growth hormone* (bGH) yang terdapat di *NCBI GenBank* (Gordon *et al.*, 1983) nomor akses M57764.1 dan sekuens Woychick *et al.* (1982). Kesamaan sekuens fragmen GH5 yang tinggi dengan sekuens yang ada memberikan keyakinan bahwa fragmen gen GH7 yang di amplifikasi memang merupakan fragmen dari gen GH. Persentase kesamaan fragmen GH5 ini dengan sekuens Gordon *et al.* (1983) dan sekuens Woichick (1990) adalah 97% .

Delesi pada posisi 1740, 1743, dan 1753 (penotip A) akan merubah sekuen dari CAGTCGTGGCTTGGGCCC menjadi CGTGTGGCTTGGGCC yang akan merubah codon CAG, TCG, TGG, CTT, GGG, CCC menjadi codon CGT, GTG, GCT, TGG, GCC sehingga merubah struktur asam amino dari Glisine, Serine, Tryptophan, Leusine, Glisine, Proline menjadi Arginin, Valine, Valine, Tryptophan, Alanine. Delesi pada posisi 1745, 1749, dan 1754 (penotip B) akan merubah sekuen TCGTGGCTTGGGCCCCTG menjadi TCGGGCTGGGCCCTG sehingga susunan codon berubah dari TCG, TGG, CTT, GGG, CCC, CTG

menjadi TCG, GGC, TGG, GCC, CTG yang merubah susunan asam amino dari Serine, Tryptophan, Leusine, Glycine, Proline, dan Leusine menjadi Serine, Glycine, Tryptophan, Alanine, dan Leusine. Delesi pada posisi 1749 dan 1754 (penotip C) akan merubah sekuen TCGTGGCTTGGGCCCCT menjadi TCGTGGCTGGGCCCCT. yang merubah codon TCG, TGG, CTT, GGG, CCC, dan CTG menjadi TCG, TGG, CTG, GGC, CCT, dan seterusnya yang merubah urutan amino dari Serine, Tryptophan, Leusine, Glycine, Proline, dan Leusine menjadi Serine, Tryptophan, Leusine, Glycine, Proline dan Alanine. Perbandingan asam amino dengan Gordon *et al.* (1983) menggunakan *software Geneious Basic* 5.6.3 dapat dilihat pada Gambar 43.



Gambar 43. Perbandingan urutan asam amino pada daerah exon 4 pada ketiga penotip (A, B, dan C) dengan Gordon *et al.* (1983)

Amplifikasi fragmen GH6 menggunakan pasangan primer GH6L dan GH6R setelah disekuensing menghasilkan sekuen sepanjang 339 bp sebagai berikut:

➔ Forward

TGTCTCTCCCTCCCTTGGCAGGAGCTGGAAGATGGCACCCCCCGGGCT
GGGCAGATCCTCAAGCAGACCTATGACAAATTTGACACAAACATGCGC
AGTGACGACGCGCTGCTYAAGAACTACGGTCTGCTCTCCTGCTTCCGG
AAGGACCTGCATAAGACGGAGACGTACCTGCGGGTCATGAAGTGCCG
CCGCTTCGGGGAGGCCAGCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGT
TTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCT
TCCTTCCWATAARATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAKTAGGTGT
CA

Hasil analisis homologi fragmen daerah exon 5 hasil amplifikasi menggunakan pasangan primer GH6L dan GH6R, menunjukkan sekuen memiliki nilai kesamaan (*similarity*) yang tinggi dengan sekuen gen *bovine growth hormone* (bGH) yang terdapat di *NCBI GenBank* (Gordon *et al.*, 1983) kode akses M57764.1 dan sekuens Woychick *et al.* (1982). Kesamaan sekuens fragmen GH6 yang tinggi dengan sekuens yang ada memberikan keyakinan bahwa fragmen gen GH6 yang diamplifikasi memang merupakan fragmen dari gen GH. Persentase kesamaan fragmen GH6 ini dengan sekuens Gordon *et al.* (1983) dan sekuen Woychick *et al.* (1982) adalah 97%.

Transisi C → T pada posisi 2230 dan transversi A → C pada posisi 2291 akan merubah codon CTC menjadi CTT dan codon CGG menjadi CGG. Kedua mutasi termasuk kedalam silent mutasi karena tidak merubah asam amino (Leusine dan Arginin). Transisi pada posisi 2230 juga ditemui pada sapi Aceh yang menunjukkan sapi pesisir mempunyai kedekatan hubungan dengan sapi Aceh.

Amplifikasi fragmen daerah flanking 3' gen GH (fragmen GH7) menggunakan pasangan primer GH7L dan GH7R setelah disekuensing menghasilkan sekuen sepanjang 423 bp sebagai berikut:

→ Forward

```
AGATGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGG
GGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGG
CATGCTGGGGATGCKGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGCTGAATAAT
TGACCCGGTTCCTCCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCTTCTC
TGTGACACACCCTGTCCACGGCCCTGGTYCTTAGTTCCAGCCCCACTCA
TAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCARTCCACYCGCTA
AAGTACTTGGAGCGGTTTCTCCCTCCCTCATCAGCCCACCAAACAAA
CCTAGCCTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAAGCAAGATAGGCTATTAA
GTACAGAGGGAGAGAAAATGCCTCCAACATGTGAGGAAGTA
```

Hasil analisis homologi fragmen GH7, menunjukkan sekuen memiliki nilai kesamaan (*similarity*) yang tinggi dengan sekuen gen *bovine growth hormone* (bGH) yang terdapat di *NCBI GenBank* (Gordon *et al.*, 1983) kode akses M57764.1 dan sekuens Woychick *et al.* (1982). Kesamaan sekuens fragmen GH7 yang tinggi dengan sekuens gen bGH yang ada di *NCBI GenBank* memberikan keyakinan bahwa fragmen gen GH7 yang diamplifikasi memang merupakan fragmen dari gen GH. Persentase kesamaan fragmen GH7 ini dengan sekuens Gordon *et al.* (1983) dan sekuen Woichick (1990) adalah 97% .

Perubahan susunan asam amino pada gen GH berpotensi mempengaruhi fungsi dari gen yang pada akhirnya akan berpengaruh kepada *performance* Sapi Pesisir.

Beberapa penelitian memperlihatkan transversi G \rightarrow C pada posisi 2141 yang menyebabkan terjadinya perubahan asam amino leucine menjadi valine mempengaruhi pertumbuhan dan berat badan pada sapi Portugis (Reis *et al.*, 2001), sifat produksi daging (Chrenek *et al.*, 1998), plemakan daging (Barense *et al.*, 2006 dan Tatsuda *et al.*, 2008)), penambahan berat badan (Tambasco *et al.*, 2003), produksi susu (Dybus *et al.*, 2002), berat karkas (Tatsuda *et al.*, 2008). Perubahan susunan asam amino pada Sapi Pesisir mungkin berhubungan dengan bobot badan Sapi Pesisir yang kecil. Perlu kajian lebih lanjut bagaimana perubahan asam amino yang terjadi pada Sapi Pesisir mempengaruhi *performance*.

VI. KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Dari penelitian ini dapat dikemukakan kesimpulan sebagai berikut:

1. Sapi Pesisir mempunyai keragaman gen GH yang tinggi dimana dari 4 fragmen yang diteliti ditemukan 18 delesi, 15 insersi dan 21 mutasi dimana 16 delesi, 12 insersi dan 19 mutasi diantaranya merupakan mutasi baru yang belum ditemukan pada gen GH yang ada di NCBI gen Bank.
2. Dari 18 delesi, 15 insersi dan 21 mutasi terdapat 10 delesi, 4 insersi, dan 17 mutasi bersifat polimorfik sehingga berpotensi untuk dijadikan marker genetic dan dapat diuji lebih lanjut untuk dapat dijadikan kandidat marker.
3. Dari 18 delesi, 15 insersi dan 21 mutasi pada gen GH Sapi Pesisir ada 6 delesi, 3 insersi dan 3 mutasi yang spesifik pada Sapi Pesisir karena terjadi pada semua sampel dan belum ditemukan pada sapi lainnya sehingga dapat digunakan sebagai marker Sapi Pesisir.
4. Berdasarkan hasil uji Chi-square tidak ditemukan adanya hubungan antara delesi, dan mutasi yang polimorfik dengan dua kelompok berat Sapi Pesisir.
5. Dibandingkan dengan sekuen yang ada di NCBI gen bank diperoleh kesamaan dengan sekuen Sapi Pesisir antara 96 – 99 %.
6. Sapi Pesisir mempunyai keragaman berat badan dan ukuran-ukuran tubuh yang sangat tinggi sehingga berpeluang untuk diperbaiki melalui seleksi.
7. Delesi pada gen GH Sapi Pesisir menyebabkan struktur asam amino gen GH Sapi Pesisir berbeda dibandingkan dengan struktur asam amino sapi yang ada di NCBI gen Bank.

Saran

1. Dengan keragaman berat badan dan ukuran-ukuran tubuh yang cukup tinggi Sapi Pesisir sangat mungkin ditingkatkan mutu genetiknya

sehingga dihasilkan Sapi Pesisir yang lebih efisien dibandingkan dengan yang ada saat ini.

2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan yang mengarah pada hubungan keragaman gen GH yang polimorfik dengan performance Sapi Pesisir. Disamping itu, perlu pula dilakukan penelitian eksplorasi terhadap gen fungsional lainnya (GHR, IGF1, IGF2, dll) dan kaitannya dengan performanse Sapi Pesisir.



DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, M.A.N. 2008. Karakterisasi Genetik Sapi Aceh Menggunakan Analisis Keragaman Fenotipik, Daerah *d-loop* DNA Mitokondria dan DNA Mikrosatelit. Sekolah Pascasarjana Institut Pertanian Bogor
- Ahluwalia, A., K.H. Clodfelter and D.J. Waxman. 2004. Sexual dimorphism of rat liver gene expression: regulatory role of growth hormone revealed by deoxyribonucleic acid microarray analysis. *Molecular Endocrinology* 18: 747-760.
- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Meyers and D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal Mol. Biol.* 215:403-410
- Argetsinger, L.S. and C. Carter-Su. 1996. Mechanism of signaling by growth hormone receptor. *Physiol. Rev.* 76:1089-1107.
- Azra'i, M. 2006. Sinergi Teknologi Marka Molekuler Dalam Pemuliaan Tanaman Jagung. *Jurnal litbang.* 25::81-89
- Barendse, W., R.J. Bunch, B.E. Harrison and M.B. Thomas. 2006. The growth hormone 1 GH1:c.457C>G mutation is associated with intramuscular and rump fat distribution in a large sampel of Australian feedlot cattle. *Animal Genetics.* 37: 211-214.
- Bollano, E., E. Omerovic, M. Bohlooly-y, V. Kujacic, B. Madhu, J. Tornell, O. Isaksson, B. Soussi, W. Schulze, M. L. X. Fu, G. Matejka, F. Waagstein and J. Isgaard. 2000. Impairment of cardiac function and bioenergetics in adult transgenic mice overexpressing the bovine growth hormone. *Endocrinology* 141:2229-2235.
- Botstein, D., R.L. White, M. Skolnick and R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Gent.* 32:314-331
- BPPT Sumbar. (2008). Pengkajian Sapi Lokal Pesisir.
http://bbp2tp.litbang.deptan.go.id/?pag=teknologi&id_tek=5&id=14
- Byatt J.C., N.R. Staten and W.J. Salgiver. 1993. Stimulation of food intake and weight gain in mature female rats by bovine prolactin and bovine growth hormone. *Am. J. Physiol.* 246: 986 - 992.
- Casas, E., S.D. Shackelford, J.W. Keele, R.T. Stone, S. M. Kappes and M. Koohmaraie. 2000. Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. *J. Anim. Sci.* 78:560-569.
- Chrenek, P., J. Kmef, I. Sakowski, D. Va icek, J. Huba and J. Chrenek. 1998. Relationships of growth hormone genotypes with meat production traits of Slovak Pied bulls. *Czech J. Anim. Sci.* 43: 541-544.
- Chung, E.R., W.T. Kim and C.S. Lee. 1998. DNA polymorphism of K-casein, β lactoglobulin, growth hormone and prolactin and insulin-like factor-1 genes in Korean cattle (Hanwoo). *Dairy Sci.* 11: 422-427

- Chung, E.R., W.T. Kim, Y.S. Kim, S.W. Hwang and C.S. Lee. 2000. Genotype effect of growth hormone, prolactin and insulin-like factor-1 genes DNA polymorphism on milk yield in Korean cattle (Hanwoo). *Asia-Australian Journal of Animal Sci.* 13 suppl a:223.
- Coulonges, C., O. Delaneau, M. Girard, H. Do, R. Adkins, J.L. Spadoni and J.F. Zagury. 2006. Computation of haplotypes on SNP subsets: advantage of the "global method". *BMC Genetics.* 7:50
- Cousin, E., J.F. Deleuze and E. Genin, 2006. Selection of SNP subsets for association studies in candidate genes: comparison of the power of different strategies to detect single disease susceptibility locus effects. *BMC Genetics.* 7:20
- Cowan, C.M., M.R. Dentine, R.L. Ax and L.A Schuler. 1989. Restriction fragment length polymorphism associated with growth hormone and prolactin gene in Holstein bull. evidence for a novel growth hormone allele. *Anim Gent.* 20:157.
- Dalia Kupstaitė, D., I. Renata, K. Natalija, B. Lina and M. Ilona, 2008. The Influence of gene polymorphism of growth hormone on reproduction traits in bulls. Abstract. *Veterinarija Ir Zootechnika.* 42:64.
- Dario C, Carnicella D, Ciotola F, Peretti Vand G. Bufano. 2008. Polymorphism of growth hormone GH1-*AluI* in Jersey cows and its effect on milk yield and, composition. *Asian. Australasian Anim. Sci.* 21: 1-5.
- Dario, C., D. Carnicella and G. Bufano. 2005. A note on the growth hormone (*GH1-AluI*) polymorphism in Podolian cattle in Southern Italy. *Animal Science Papers and Reports* 23:43-49.
- Davis, M. E., M. D. Bishop, N. H. Park and R. C. M. Simmen, 1995. Divergent selection for blood serum insulin-like growth factor I concentration in beef cattle: I. Nongenetic effects. *J. Anim. Sci.* 73:1927–1932.
- Davis, M.E., and R. C. M. Simmen. 1997. Genetic parameter estimates for serum insulin-like growth factor I concentration and performance traits in Angus beef cattle. *J. Anim. Sci.* 75:317–324.
- de Mattos, K.K., S.N. Del Lama, M.L. Martinez and A.F. Freitas. 2004. Association of bGH and Pit-1 gene variants with milk production traits in dairy Gyr bulls. *Pesq. Agropec. Bras.* 39:147-150
- Demeyer, D., and K. Saejima 1991. Animal biotechnology and a meat procesing, In animal biotechnology and the quality of meat production, Elsevier Science Publisher B.V.
- DGLS. 2002. State of Management of Farm Domestic Animal Genetic Resources in Indonesia. Directorate Genrale of Livestock Services (DGLS), Directorate of Livestock Breeding. Indonesia
- Dinas Peternakan Pesisir Selatan. 2008. 2010 Pessel Swasembada Sapi. *Harian Singgalang Selasa*, 22 Juli 2008
- Duryadi, D. 1993 Role Possible du Comnortement dans l 'evolution de Deux Souris Mus Macedonecus et Mus Spicilequs en Europe Central.

These Doctorat. Universite Montpellier II, Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, France.

- Dybus A 2002a. Association of Growth Hormon and Prolactin genes polymorphisms with milk production traits in Polish Black and White Cattle. *Anim. Sci.* 20:203-212.
- Dybus A 2002b. Associations between Leu/Val polymorphism of growth hormon gene and milk production traits in Black and White cattle. *Arch. Tierz. Dummerstorf.* 45:421-428
- Dybus, A., G. Wilhelm, S. Iwona and B. Piotr. 2004. Association between the growth hormon combined genotypes and dairy traits in Polish Black-and-White cows. *Animal Science Papers and Reports* 22:185-194
- Dybus, A., M. Kmiec, Z. Sobek and B. Wisniewski. 2002. Association between polymorphism of the growht hormon gene and production traits of Limousin cattle. *Animal Science Papers and Report* 20:203-212.
- Eleswarapu, S., and H Jiang. 2005. Growth hormon regulates the expression of hepatocyte nuclear factor-3 gamma and other liver-enriched transcription factors in the bovine liver. *Journal of Endocrinology* 184:95-105
- Etherton, T.D. and D.E. Bauman. 1998. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physical Rev.* 78:745-61.
- Evans, D.M. and L.R. Cardon. 2004. Guidelines for genotyping in genomewide linkage studies: single-nucleotide-polymorphism maps versus microsatellite maps. *Am. J. Hum Gent* 75:687-692.
- Falaki, M., N. Gengler, M. Sneyers, A. Prandi, S. Massart, A. Formigoni, A. Burny, D. Portetelle and R. Renaville. 1996. Relationships of polymorphisms for growth hormon and growth hormon receptor genes with milk production traits for Italian Holstein-Friesian bulls. *J. Dairy Sci.* 79:1446-1453.
- Falconer, D.S. 1996. *Introduction to Quantitative Genetics*. Fourth Ed. Longman Inc., New York.
- Feng, X. P., U. Kuhnlein, S. E. Aggrey, J. S. Gavora and D. Zadworny. 1997. Trait association of genetic markers in the growth hormon and the growth hormon receptor gene in a White Leghorn strain. *Poult. Sci.* 76:1770-1775.
- Ferraz, A. L. J., J.C. Bortolossi, R.A. Curi, M.I.T. Ferro, J.A. Ferro and L.R. Furlan. 2006. Identification and characterization of polymorphisms within the 5' flanking region, first exon and part of first intron of bovine GH gen. *Journal of Animal Breeding and Genetics.* 123 :208-212.
- Flores-Morales, A., N. Stahlberg. P. Tollet-Egnell, J. Lundeberg, R.L. Malek, J. Quackenbush, N.H. Lee and G. Norstedt. 2001. Microarray analysis of the in vivo effects of hypophysectomy and growth hormon treatment on gene expression in the rat. *Endocrinology* 142:3163-3176.
- Frohman, L.A. 1995. *Diseases of the anterior pituitary, in endocrinology and metabolism*. Ed. McGraw Hill, Inc.

- Ge, W., M.E. Davis, H.C. Hines and K.M. Irvin. 1999. Two-allelic DGGE polymorphism detected in the promoter region of the bovine GHR gene. *Anim. Gent.* 30:71.
- Ge, W., M.E. Davis, H.C. Hines and K.M. Irvin. 2000. Rapid Communication: Single nucleotide polymorphisms detected in exon 10 of the bovine growth hormone receptor gene. *J. Anim.Sci.* 78:2229–2230.
- Ge, W., M.E. Davis, H.C. Hines, K.M. Irvin and R.C.M. Simmen. 2001. Association of a genetic marker with blood serum insulin-like growth factor-1 concentration and growth traits in Angus cattle *J. Anim. Sci* 79:1757-1762
- Ge, W., M.E. Davis, H.C. Hines, K.M. Irvin and R.C.M. Simmen. 2003. Association of single nucleotide polymorphisms in the growth hormone and growth hormone receptor genes with blood serum insulin-like growth factor I concentration and growth traits in Angus cattle. *J. Anim. Sci.* 81:641–648
- Goddard, K.A.B., E.M. Wijsman. 2002.Characteristics of genetic markers and maps for cost-effective genome screens using diallelic markers. *Gent Epidemiol* 22:205-220.
- Gorbani, A., R. Vaeztorshizi, M. Bonyadi and C. Amirinia, 2009. Restriction fragment length polymorphism of bovine growth hormone gene intron 3 and its association with testis biometry traits in Iranian Holstein bull. *African Journal of Microbiology Research* 3:809-814.
- Gordon, D.F., D.P. Quick, C.R. Erwin, J.E. Donelson and R.A. Maurer. 1983. Nucleotide sequence of the bovine growth hormone chromosomal gene. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 33:81-95.
- Grochowska, R., L. Zwierzchowski, M. Snochowski and Z. Reklewski. 1999. Stimulated growth hormone (GH) release in Friesian cattle with respect to GH genotypes. *Reprod. Nutr. Dev.* 39:171–180.
- Guyton, A.C. and J.E. Hall. 1996. *Textbook of medical physiology*. 9 Ed. W.F. Saunders Company.
- Hartl D.L. and A.G. Clarck. 1989. *Principles of Population Genetics*. 2nd Ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.
- Harvey, S., C.G. Scanes and W.H. Daughaday. 1995 *Growth Hormon*. Boca Raton: CRC Press
- Heap, D., M.C. Lucy, R.J. Collier, C.K. Boyd, W.C. Warren, C. Hecht and H. Geldermann. 1996. Variants within the 5'-flanking region and intron I of the bovine growth hormone gene. *Anim. Gent.* 27:329–332.
- Hediger, R., S.E. Johnson, W. Barendse, R.D. Dringwater, S.S. Moor and J. Hetzel. 1990 Assignment of the growth hormone gene locus to 19q26qter in cattle and to 11q25-qter in sheep by in situ hybridization. *Genome* 8:171-174.
- Ho, K. Y. and D. M. Hoffman. 1993. Aging and growth hormon. *Horm. Res.* 40:80–86.

Hoj, S., M. Fredholm, N.J. Larsen and V.H. Nielsen. 1993. Growth hormone gene polymorphism associated with selection for milk fat production in lines of cattle. *Anim. Genet.* 24:91–95.

<http://id.shvoong.com/medicine-and-health/medicine-history/2066425-pengertian-elektroforesis/>. Di akses 28 Februari 2012

http://id.wikipedia.org/wiki/Biologi_molekular. Di akses 28 Februari 2012

http://media.invitrogen.com.edgesuite.net/ab/applications-technologies/pharmabiotherapeutics/DNA_sekuensing.swf. Di akses 28 Februari 2012

<http://pesselkab.bps.go.id>. Di akses 28 Februari 2012

<http://sciencebiotech.net/interpretasi-chromatogram-hasil-dna-sekuensing/>. Di akses 28 Februari 2012

<http://sciencebiotech.net/mengenal-pcr-polymerase-chain-reaction>. Di akses 28 Februari 2012

<http://sciencebiotech.net/mengenal-teknik-dna-sekuensing/>. Di akses 28 Februari 2012

<http://sciencebiotech.net/parameter-penting-desain-primer/>. Di akses 28 Februari 2012

<http://sciencebiotech.net/yuk-mendesain-primer-dengan-primer3plus>. Di akses 28 Februari 2012

<http://www.pesisirselatan.go.id>. Di akses 28 Februari 2012

Hull, K. L. and S. Harvey. 2001. Growth hormon: Roles in female reproduction. *J. Endocrinol.* 168:1–23.

Jakaria. 2008. Keragaman Genetik Gen Homon Pertumbuhan Pada Sapi Pesisir Sumatera Barat. Disertasi Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor.

Jamsari 2008. Preparasi DNA Species *Collectotrichum* sp. Dan Spesifitas Sistem Fingerprinting RAPD. *Jurnal Natur Indonesia* 11:31-39

Jamsari dan I. Ferita, 2010. Pengembangan Metode Preparasi DNA Cepat, Hibridasi DNA Genomik-Produk PCR dan visulisainya unuk Mendukung Sistem Deteksi Dini patogen Anthraknosa pada Pertanaman Cabai. Laporan Hibah Bersaing tahun anggaran 2009. Padang. 33 hal

Jamsari. 2007. Bioteknologi Pemula. Prinsip Dasar dan Aplikasi Analisis Molekuler. Unri Pres Pekanbaru. 193 hal.

Johannsson, G., Y.B. Sverrisdottir, L. Ellegard, P.A. Lundberg and H. Herlitz. 2002. GH increases extracellular volume by stimulating sodium reabsorption in the distal nephron and preventing pressure naturiesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87:1743–1749

John, S., N. Shephard, G. Liu, E. Zeggini, M. Cao, W. Chen, N. Vasavda, T. Mills, A. Barton, A. Hinks, S. Eyre, K.W. Jones, W. Ollier, A. Silman, N. Gibson, J. Worthington and G. C. Kennedy. 2004. Whole-genome scan, in a complex disease, using 11,245 single-nucleotide polymorphisms: comparison with microsatellites. *Am. J. Hum. Gent.* 75:54-64.

- Kaminski, S. and M. Wachek. 2002. Single-stranded conformation polymorphism within the porcine growth hormone gene promoter *Animal Science Papers and Report* 20:47-53.
- Kashi, Y., E. Hallerman and M. Soller. 1990. Marker-assisted selection of candidate bull for progeny testing programmes. *Anim Prod.* 51:63,
- Katoh K., S. Kouno, A. Okazaki, K. Suzuki and Y. Obara. 2008. Interaction of GH polymorphism with body weight and endocrine functions in Japanese black calves. *Domestic Anim. Endocrinol.* 34:25–30.
- Kemenes. P.A., I.C.A. Regitano, A.J.M. Rosa, I.U. Paker, A.G. Razook, L.A. Figueiredo, N.A. Silva, M.A.L. Etchigaray and I.L.L. Coutinho 1999. κ -casein and β -lactoglobulin and growth hormone allele frequencies and genetic distances in Nelore, Gyr, Guzera, Caracu, Charolais, Canchim and Santa Gertrudis cattle. *Genetic and Molecular Biology* 22:539-541.
- Kennedy, G.C., H. Matsuzaki, S. Dong, W.M. Liu, J. Huang, G. Liu, X. Su, M. Cao, W. Chen, J. Zhang, W. Liu, G. Yang, X. Di, T. Ryder, Z. He, U. Surti., M.S. Phillips, M.T. Boyce-Jacino, S.P. Fodor, K.W. Jones. 2003. Large scale genotyping of complex DNA. *Nat Biotechnol*, 21:1233-1237.
- Khasrat. 2006. Pertumbuhan Karakteristik Karkas dan Kualitas Daging Sapi Pesisir Yang Diperlihara Secara Intensif Pada Periode Waktu Yang Berbeda. Disertasi Program Pascasarjana Universitas Andalas
- Khatami, S.R., O.E. Lazebnvi, V.F. Maksimenko and G.E. Sulimova, 2005. Association of polymorphisms of the growth hormone and prolactin genes with milk productivity in Yaroslavl and black-and white cattle. *Genetika.* 41: 229-229.
- Knorr, C., G. Moser, E. Muller and H. Geldermann. 1997. Associations of GH gene variants with performance traits in F2 generations of European wild boar, Pietrain and Meishan pigs. *Anim. Gent.* 28:124–128.
- Kruglyak, L. 1997. The use of a genetic map of biallelic markers in linkage study. *Nat. Gent.* 17:21-24.
- Kuhnlein, U., L. Ni, S. Weigend, J.S. Gavora, W. Fairfull and D. Zadworny. 1997, DNA polymorphism in the chicken growth hormone gene. response to selection for disease resistance and association with egg production *Animal Genetic.* 28:116-123.
- Kumar, Sudhir and K. Tamura. 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software. Arizona State University. Arizona USA.
- Lagziel, A., S. DeNise, O. Hanotte, S. Dhara, V. Glazko, A. Broadhead, R. Davoli, V. Russo, and M. Soller. 2000. Geographic and breed distribution of an *MspI* PCR-RFLP in the bovine growth hormone (bGH) gene. *Anim. Genet.* 31:210-213
- Lagziel, A., E. Lipkin and M. Soller. 1996. Association between SSCP haplotypes at the bovine growth hormone gene and milk production traits. *Genetics.* 142: 945-951.

- Lazebnaya, I.V., O.O. Lazebny, and G.E. Sulimova. (2010). Study of genetic variation in Yakutian Cattle (*Bos Taurus*) using the Prolactin *bPRL*, growth hormone *bGH*, and transcription factor *bPit-1* genes. Russian Journal of genetics. 46:377-380
- Lechniak, D., G. Machnik, M. Szydlowski and M. Switonski. 1999. Growth hormone gene polymorphism and reproductive performance of AI bulls. Theriogenology 52:1145-1152.
- Lee, S.S., J.H. Kim., J. Jong., and N.H. Park. 2002. Relationships between bovine growth hormone gene polymorphism and semen characteristics in Hanwoo bull. Livestock Improvement Center and NACF.
- Lefebvre, V., B. Goffinet, J. Chauvet, B. Caromel, P. Signoret, R. Brand, and A. Palloix. 2001. Evaluation of genetic distance between pepper in breed lines for cultivar protein purpose : comparison of AFLP, RAPD, and phenotypic data. Theor. Appl. Genet. 102:741-750
- Lemmey, A.B., J. Glassford, H.C. Flick-Smith, J.M. Holly and J.M. Pell. 1997. Differential regulation of tissue insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP)-3, IGF-I and IGF type 1 receptor mRNA levels, and serum IGF-I and IGFBP concentrations by growth hormone and IGF-I. Journal of Endocrinology. 154:319-328.
- Lii, W. H. And D. Gaur. 1991. Fundamentals of Molecular Evolution. Sinauer Associates Inc. Publisher. Sunderland, Massachusetts.
- Lin, J. and K.Y. Liu. 2005. Linkage and association analyses of microsatellites and single-nucleotide polymorphisms in nuclear families. BMC Genetics. 6(Suppl 1):S25
- Lincoln, D. T., F. Sinowatz, E. el-Hifnawi, R. L. Hughes and M. Waters. 1995. Evidence of a direct role for growth hormone (GH) in mammary gland proliferation and lactation. Anat. Histol. Embryol. 24:107-115.
- Liron. J.P., M.V. Ripoli, J.C. De Luca, P. Preral-Garcia and G. Giovambattista. 2002. Analysis genetic diversity and population structure in Argentine and Bolivian Creole cattle using five loci related to milk production. Genetic and Molecular Biology. 25:413-419.
- Liu, N., L. Chen, S. Wang, C. Oh, and H. Zhao. 2005. Comparison of single-nucleotide polymorphisms and microsatellites in inference of population structure. BMC Genetics. 6:S26
- Lucy, M. C., S. D. Hauser, P. J. Eppard, G. G. Krivi and R. J. Collier. 1991. Genetic polymorphism within the bovine somatotropin (bST) gene detected by polymerase chain reaction and endonuclease digestion. J. Dairy Sci. 74(Suppl. 1):284.
- Lucy, M.C., S.D. Hauser, P.J. Eppard, G.G. Krivi, J.H. Clark, D.E. Bauman and R.J. Collier. 1993. Variants of somatotropin allele in cattle: Gene frequencies in major dairy breeds and associated milk production. Dom. Anim. Endocrinol. 10:325-333.

- Marshall, D.M and J. Kim. 2003. Association of Beef Production Traits with Polymorphisms in the Growth Hormon Gene and Insulin-Like Growth Factor-1 Gene. Department of Animal and Range Sciences SDSU
- Martojo, H. 2003. Indigenous Bali Cattle: The Best Suited Cattle Breed for Sustainable Small Farm in Indonesia. The Chinese Society of Animal Science 112 Farm Road. Hsinhua, Tainan, Taiwan.
- Masoudi A.K, H. Omrani and A. Torkamanzehi. 2002. Study of growth hormone gene polymorphism in Iranian *bos indicus* cattle by PCRRFLP technique: Proceeding of the First Seminar on Genetics and Breeding Applied to Livestock Poultry and Aquatics at Tehran, Iran. 141-145.
- Mathews, L.S., G. Norstedt and R.D. Palmiter. 1986. Regulation of insulin-like growth factor I gene expression by growth hormon. PNAS. 83:9343-9347.
- Matise, T.C., R. Sachidanandam, A.G. Clark, L. Kruglyak, E. Wijsman, J. Kakol, S. Buyske, B. Chui, P. Cohen, C. de Toma, M. Ehm, S. Glanowski, C. He, J. Heil, K. Markianos, I. McMullen, M.A. Pericak-Vance, A. Silbergleit, L. Stein, M. Wagner, A.F. Wilson, J.D. Winick, E.S. Winn-Deen, C.T. Yamashiro, H.M. Cann, E. Lai and A.L. Holden. 2003. A 3.9-centimorgan-resolution human single-nucleotide polymorphism linkage map and screening set. Am. J. Hum. Gent. 73:271-284.
- Merkens, J. 1926. De Paarden en Runder teelt in Ned. Indie. Veeartsnijkundige Mededeeling (51). Department Van Landbouw Nijyerhied er Handel.
- Middleton, F.A., M.T. Pato, K.L. Gentile, C.P. Morley, X. Zhao, A. Eisner, A. Brown, T.L. Petryshen, A.N. Kirby, H. Medeiros, C. Carvalho, A. Macedo, A. Dourado, I. Coelho, J. Valente, M.J. Soares, C.P. Ferreira, M. Lei., M.H. Azevedo, J.L. Kennedy, M.J. Daley, P. Sklar and C.N. Pato. 2004. Genomewide linkage analysis of bipolar disorder by use of a highdensity single-nucleotide-polymorphism (SNP) genotyping assay: a comparison with microsatellite marker assays and finding of significant linkage to chromosome 6q22. Am. J. Hum. Gent. 74:886-897.
- Mitra A, P. Sciile, CR Balakrisiinan, F. Pirciiner. 1995. Polymorphisms at growth hormone and proclatin loci in Indian cattle and buffalo. J. Anim. Breed. Genet. 112:71-74
- Mohammadabadi M.R, A. Torabi, M. Tahmourespoor, A. Baghizadeh, A. Esmailizadeh Koshkoieh and A. Mohammadi, 2010. Analysis of bovine growth hormone ene polymorphism of local and Holstein cattle breeds in Kerman province of Iran using polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). African Journal of Biotechnology. 9:6848-6852.
- Muhaghegh, M.D., S.L. Goswami and S. De. 2006. Single strand conformation polymorphism (SSCP) in 3' region of growth hormon gene in five breeds of Indian buffalo. Animal Science Papers and Reports. 24:159-162
- Murray, R.K., D.K. Granner and P.A. Mayer. 1996. Harper's biochemistry, 24 Ed. Prentice-Hall Internasional Inc.

- Nasir, N. 2000. Gambir, Budidaya, pengolahan, dan Diversifikasinya. Hutanku. Padang. 286 ha
- Nei, M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press New York.
- Noor, R. R. 1996. Genetika Ternak. Penebar Swadaya. Jakarta
- Noor, R.R. 2004. Sapi Pesisir Sumbar Potensial Dikembangkan Suara Merdeka: Minggu, 28 November 2004.
- Olsson, B., Y.M. Bohlooly, O. Brusehed, O.G. Isaksson, B. Ahren., S.O. Olofsson, J. Oscarsson and J. Tornell. 2003. Bovine growth hormone-transgenic mice have major alterations in hepatic expression of metabolic genes. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 285:E504-E511.
- Ooi, G.T., F.J. Cohen, L.Y. Tseng, M.M. Rechler and Y.R. Boisclair. 1997. Growth hormone stimulates transcription of the gene encoding the acid-labile subunit (ALS) of the circulating insulin-like growth factor-binding protein complex and ALS promoter activity in rat liver. *Molecular Endocrinology*. 11: 997-1007.
- Oprzadek, J., M. Lukaszewicz., E. Dymnicki and Zweirzchowski. 2003. Relationship between growth hormone, κ -casein and β -lactoglobulin genotypes and selected biochemical blood indicators in young Freisian cattle. *Animal Science Papers and Report*. 21:223-231
- Pant, S.D., F.S. Schenkel, I. Leyva-Baca, B.S. Sharma, N.A. Karrow. 2007. Identification of single nucleotide polymorphisms in bovin CARD15 and their association with health and producton Canadian Holsteins. *BMC Genomic*. 8:421
- Park, H.B. 2004. Genetic analysis of Quantitative Traits Using Domestic Animals: A Candidate Gene and Genome Scanning Approach Dissertation Uppsala University. Sweden.
- Pawar R.S., K.R. Tajane, C.G. Joshi, D.N. Rank, B.P. Bramkshtri. 2007. Growth hormone gene polymorphism and its association with lactation yield in dairy cattle. *Indian J. Anim. Sci.* 77: 884-888.
- Peralta, J.M., T.D. Dyer, D.M. Warren, J. Blangero and L. Almasy, 2005. Linkage disequilibrium across two different single-nucleotide polymorphism genome scans. *BMC Genetics*. 6 (Suppl 1)
- Peterson, A.H., S.D. Tanskley and M.E. Soller. 1991. DNA marker in plant improvement. *Advances in Agronomy* 44:39-44
- Pierzchala, M., T. Blicharski and J. Kuryl. 2004. Growth rate and carcass quality in relation to GH1Mspl and GH1Haell PCR-RFLP polymorphism in pig *Animal Science Papers and Report* 22:57-64.
- Rahmani, N. 2003. Analisis Hubungan Polimorfisme Gen Bovine Growth Hormon (bGH) Exon III-Exon IV dan Gen Ornithine Dearboxylase (ODC) Intron VIII - Exon IX dengan Produksi dan Kualitas Susu pada Sapi Perah

- Freisian Holstein di BPTU Baturraden. Tesis. Program Pascasarjana IPB. Bogor.
- Regitano, L.C.A., J.L. Vencovsky, I.U. Packer, P.F. Barbosa, A.J.M. Rosa, N A. Silva, M.A.L. Etchegaray and L.L. Coutinho. 1999. Selection for breed specific growth hormon and IGF-1 alleles in synthetic beef cattle cross. *Canchim Gen. Ann. Mol. Breed.* 22:531-537.
- Reis, C., D. Navas., N. Pereira., and A. Cravador. 2001. Growth hormon Alul polymorphism analysis in eight Portuguese bovine breeds *Arch. Zootec.* 50:41-48.
- Rocha J.L., J.F. Baker, J.E. Womack and J.O. Sanders. 1990. Statistical associations between restriction fragment length polymorphisms and quantitative traits in beef cattle. *Revista Brasileira de Reproducao Animal.* 2: 35-42.
- Rosenbloom, A. L., R. G. Rosenfeld and J. Guevara-Aguirre. 1997. Growth hormon insensitivity. *Pediatr. Clin. North. Am.* 44:423-442.
- Rotwein, P., A. M. Gronowski and M. J. Thomas. 1994. Rapid nuclear actions of growth hormon. *Horm. Res.* 42:170-175.
- Ruprechter, G, M. Carriquiry, J. M. Ramos, I. Pereira and M. Ana. 2011. Metabolic and endocrine profiles and reproductive parameters in dairy cows under grazing conditions: effect of polymorphisms in somatotropic axis genes. *Acta Veterinaria Scandinavica.* 53:35
- Rusfidra, A. 2005. Quo Vadis Sapi Pesisir. http://www.bung-hatta.info/tulisan_126.ubh diakses 28 Februari 2012
- Sadeghi, M., M. Shahr-e-Babak, G. Rahimi and A. Nejati Javaremi. 2008. Association between gene polymorphism of bovine growth hormon and milk traits in the Iranian holstein bulls. *Asian Journal of Animal Science* 2:1-6
- Saladin, R. 1983. Penampilan Sifat-sifat Produksi dan Reproduksi Sapi Lokal Pesisir Selatan di Propinsi Sumatera Barat. Disertasi. Fakultas Pascasarjana IPB. Bogor.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual.* CSH Laboratory Press. USA.
- Sanger, F., S. Nicklen, A.R. Coulson. 1977. DNA sekuensing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl, Acad. Sci. USA.* 74:5463-5467.
- Sarbaini. 2004. Kajian Keragaman Karakteristik Eksternal dan DNA Mikrosatelit Sapi Pesisir Sumatera Barat. Disertasi Sekolah Pascasarjana IPB. Bogor.
- Sari, E.M. 2011. Keragaman Genetik Gen Hormon Pertumbuhan (Gh) Dan Hubungannya Dengan Kualitas Karkas Pada Sapi Aceh. Disertasi. Sekolah Pascasarjana IPB Bogor.
- SAS. 2002. *SAS User's Guide: Statistics.* Release 9.02 Edition, SAS Institute Inc., Cary. NC, USA.

- Schlee, P., R. Graml, E. Schallenberger, D. Schams, O. Rottmann, A. Olbrich-Bludau and F. Pirchner. 1994. Growth hormone and insulin-like growth factor I concentrations in bulls of various growth hormone genotypes. *Theor. Appl. Genet.* 88:497-500.
- Schleif, R. 1993. *Genetics and Molecular Biology*. second edition. The Johns Hopkins University Press Baltimore and London.
- Sciilee, A.P., C.R. Balakrisiinan and F. Pirciiner. 1995. Polymorphisms at growth hormone and prolactine loci in Indian cattle and buffalo. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 112:71-74.
- Seneviratne C., J.M. Luo and L.J. Murphy. 1990. Transcriptional regulation of rat insulin-like growth factor-binding protein-1 expression by growth hormone. *Molecular Endocrinology*. 4:1199-1204.
- Shariflou, M.R., C. Moran and F.W. Nicholas. 2000. Association of the Leu¹²⁷ variant of the bovine growth hormone (bGH) gene with increased yield of milk, fat, and protein in Australian Holstein-Friesians. *Australian Journal of Agricultural Research*. 51:515-522
- Sirja, V., J. Szyda, S. Blott, N. Schulman, M. Lidauer, A. Ma'ki-Tanila, M. Georges and Johanna Vilkki. 2006. The role of the bovine growth hormone receptor and prolactin receptor gens in milk, fat and protein production in Finnish Ayrshire dairy cattle. *Genetics*. 173: 2151-2164.
- Smith, L.M., J.Z Sander., R.J. Kaiser., P. Hughes., C Dodd., C R Connell., C. Heiner., S.B. Kent., and L.E. Hood. 1986. Flourescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*. 321:674-679
- Sodhi, M., M. Mukesh, B. Prakash, B. Mishra, R. Sobti, K. Singh, S. Singh and S. Ahlawat. 2007. *MspI* Allelic Pattern of Bovine Growth Hormone Gene in Indian Zebu Cattle (*Bos indicus*) Breeds. *Biochemical Genetics*. 45:145-153
- Sole, X., E. Guino, J. Valls, R. Iniesta and V. Moreno. 2006. SNPtats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatic* 22:1928-1929.
- Soller, M., and J. S. Beckmann. 1983. Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. *Theior. Appl Genet.* 76:25-33
- Song, C.Y., R.B. Gao, Y. Tao and J.D. Mao. 2003. Study on pig growth hormone gene polymorphisms in western meat type breeds and Chines local breeds. *J. Zhejiang Univ. Sci.* 4:734-739.
- Sorensen, P., R Grochowska, L. Holm, M. Henyon and P. Lovendahl. 2002. Polymorphism in the bovine growth hormone gene effects endocrine release in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 85:1887-1893.
- Sri Rahayu., B.B. Sumitro, T. Susilawati dan Soemarno. 2006. Identifikasi Polimorfisme Gen GH (*Growth Hormon*) Sapi Bali Dengan metode PCR-RFLP. *Berk. Penel. Hayati*: 12:7-11.
- Stansfield, W.D., S. Jaime, R. Colome and J. Cano. 2006. *Bologi Molekuler dan Sel*. Alih bahasa oleh Amalia safitri. Erlangga Jakarta.

- Steel, R.G.D., J.H. Torrie and D.A. Dickey. 1997. Principle and Procedure of Statistics a Biometrical Approach. 3rd edition
- Sukmasari, A.H, 2001. Pendugaan Nilai Pemuliaan dan Kecenderungan Genetik (Genetic Trends) Bobot Badan Sapi Bali di proyek Pembibitan dan Pengembangan Sapi Bali (P3 Bali) di Bali. Tesis Sekolah Pascasarjana IPB.
- Sumantran, V. N., M.L. Tsai and J. Schwartz. 1992. Growth hormon induces c-fos and c-jun expression in cells with varying requirements for differentiation. *Endocrinology* 130:2016–2024
- Tambasco, D.D., C.C.P. Paz., M.T. Stuart, A.P. Pereira, M.M. Alencar, A.R. Freitas, L.L. Coutinho, I.U. Packer and L.C.A. Regitano. 2003 Candidate genes for growth traits in beef cattle crosses *Bos taurus* x *Bos indicus*. Abstract. *J. An. Breeding and Genetics*. 120:51
- Tatsuda, K., A. Oka, E. Iwamoto, Y. Kuroda, H. Takeshita, H. Kataoka and S. Kouno. 2008. Relationship of the bovine growth hormon Gene to Carcass Traits in Japanese Black Cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 125:45-49
- Tayo, B.O., Y. Liang, S. Stranges and M. Trevisan. 2005. Genome-wide linkage analysis of age at onset of alcohol dependence: a comparison between microsatellites and single-nucleotide polymorphisms. *BMC Genetics*. 6(Suppl 1):S12
- Thompson, B.J., C.A. Shang., and M.J. Waters. 2000. Identification of genes induced by growth hormon in rat liver using cDNA arrays. *Endocrinology*. 141:4321–4324.
- Tollet-Egnell, P., A. Flores-Morales, A. Stavreus-Evers, L. Sahlin and G. Norstedt. 1999. Growth hormon regulation of SOCS-2, SOCS-3, and CIS messenger ribonucleic acid expression in the rat. *Endocrinology*. 140:3693–3704
- Ulgen, A. and W. Li. 2005. Comparing single-nucleotide polymorphism marker-based and microsatellite marker-based linkage analyses. *BMC Genetics*. 6(Suppl 1):S13
- Unanian, M.M et al.,2002. Possible association between bovine growth hormone gene polymorphism and reproductive traits. *Braz. Arch. Biol. Technol*. 45:129-134
- Unanian, M.M., C.C. Barreto, A.R. de Freitas, C.M.T. Cordeiro and L.A. Josahkian. 2000. Association between growth hormon gene polymorphism and weight traits in Nellore Novines. *Rev Bras. Zootec*. 29:1380-1386.
- Unanian, M.M., S.K. DeNise, H.M. Zhang. R.L. Ax. 1994. Rapid communication polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism in the bovine growth hormon gene. *J. Anim. Sci*. 72:2203
- Valera, A., J.E. Rodriguez-Gil, J.S. Yun, M.M. McGrane, R.W. Hanson, and F. Bosch. 1993. Glucose metabolism in transgenic mice containing a chimeric P-enolpyruvate carboxykinase/bovine growth hormon gene. *FASEB Journal* 7:791–800.

- P-enolpyruvate carboxykinase/bovine growth hormon gene. *FASEB Journal* 7:791-800.
- Vukasinovic, N., S. K. Denise and A. E. Freeman. 1999. Association of growth hormon loci with milk yield traits in Holstein bulls. *J. Dairy Sci.* 82:788-794.
- Walker, M.R., and R. Rapley. 1997. *Route Maps in Gene Technology*. Blackwell Science. London
- Wang, D.G., J.B. Fan, C.J. Siao, A. Berno, P. Young, R. Sapolsky, G. Ghandour, N. Perkins, E. Winchester, J. Spencer, L. Kruglyak, L. Stein, L. Hsie, T. Topaloglou, E. Hubbell, E. Robinson, M. Mittmann, M.S. Morris, N. Shen, D. Kilburn, J. Rioux, C. Nusbaum, S. Rozen, T.J. Hudson, R. Lipshutz, M. Chee, E.S. Lander. 1998. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science*. 280:1077-1082
- Warly, L., A. Kamaruddin, Hermon, R.W.S. Ningrat dan Elihasridas. 1998. Pemanfaatan Hasil Ikutan Agroindustri Sebagai Bahan Makanan Ternak Rumansia, Evaluasi Secara *in vivo*. Laporan Penelitian Proyek Hibah Bersaing V/2/1997/1998. Direktorat Pembinaan Penelitian dan Pengabdian Pada Masyarakat, Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Jakarta.
- Warwick, E.J., J. M. Astuti, dan W. Hardjosubroto. 1990. *Ilmu Pemuliaan Ternak*. Edisi Kelima. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta.
- Weising K., R.G. Atkinson and R.C. Gardner. (1995) Genomic fingerprinting by microsatellite-primed PCR: a critical evaluation. *PCR Meth Applications*. 4:249-255
- Wilson, A.F., A.J. Sorant. 2000. Equivalence of single- and multilocus markers: power to detect linkage with composite markers derived from biallelic loci. *Am. J. Hum. Gent.* 66:1610-1615.
- Woychik, R.P., S.A. Camper, R.H. Lyons, S. Horowitz, E.C. Goodwin and F.M. Rottman. 1982. Cloning and nucleotide sequence of the bovine growth hormon gene. *Nucleic Acids Res.* 10:7197-7210.
- Xing, C., F.R. Schumacher, G. Xing, Q. Lu, T. Wang and R.C. Elston, 2005. Comparison of microsatellites, single-nucleotide polymorphisms (SNP) and composite markers derived from SNP in linkage analysis. *BMC Genetics*. 6(Suppl 1):S29
- Yao, J., S. E. Aggrey, D. Zadworny, J. F. Hayes and U. Kuhnlein. 1996. Sequence variations in the bovine growth hormon gene characterized by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis and their association with milk production traits in Holsteins. *Genetics*. 144:1809-1816.
- Yardibi H., G.T. Hosturk, I. Paya, F. Kaygisiz, G. Ciftioglu, A. Mengi, K. Oztabak. 2009. Associations of growth hormon gene polymorphisms with milk production traits in South Anatolian and East Anatolian Red cattle. *J Anim. Vet. Adv.* 8: 1040-1044

- Yue, Q., V. Apprey and G.E. Bonney. 2005. Which strategy is better for linkage analysis: single-nucleotide polymorphisms or microsatellites? Evaluation by identity-by-state – identity-by-descent transformation affected sib-pair method on GAW14 data. *BMC Genetics*. 6(Suppl 1):S16
- Yuwono, T. 2006. Teori dan Aplikasi Polimerase Chain Reaction. Penerbit Andi. Yogyakarta. 239 hal.
- Zakizadeh, S., S.G. Rahimi, S.R. Mirae-Ashtiani, A. Nejati-Javeremi, M. Moradi-Shahrbabak, P. Reinecke, M. Reissmann, A.A. Masoudi, C. Amiriana and S.A. Mirhadi. 2006. Analisis of bovine growth hormon gene polymorphism in three Iranian Native Breed and Holstein cattle by RFLP-PCR. *Biotechnology*. 5:385-390.
- Zhang, H.M., D.R. Brown, S.K. Denise and R.L. Ax. 1992. Nucleotide sequence determination of a bovine somatotropin allele. *Anim. Gent*. 23:578.
- Zhang, H.M., D.R. Brown, S.K. Denise and R.L. Ax. 1993. Rapid communication: polymerase chain reaction-restriction fragment lenght polymorphism analysis of the bovine somatotropin gene. *J. Anim. Gent*. 71:2276.
- Zhao, Q., M.E. Davis and H. C. Hines. 2004. Associations of polymorphisms in the Pit-1 gene with growth and carcass traits in Angus beef cattle. *J. Anim. Sci*. 82:2229–2233
- Zhou, G.L., H.G. Liu, C. Liu, S.L. Guo, Q. Zhu, Y.H. Wu 2005. Association of genetic polymorphism in GH gene with milk production traits in Beijing Holstein cows. *J Biosci*.30::595-598.
- Zwierzchowski, L., J. Kryzyszewski, N. Strzalkowska, E. Siadkowska and Z. Ryniewicz. 2002. Effect of polymorphism of growth hormon (GH). *Fit1*, and leptin (LEP) genes, cow's ege, lactation stage and somatic cell count on milk yield and composition of Polish Black and White cow. *Animal Science Papers and Report* 20:213-227

Lampiran 1. Sekuen oligonukleotida gen GH daerah intron 3 exon 3 hasil amplifikasi menggunakan pasangan primer GH4L dan GH4R

	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470
	CC-G-T-GC-TTCTGCTTCTCTG-AACCATCCCGGCCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAA						
Gordon →	CCAGGTGCTTCTGCTTCTCTGAAACCATCCCGGCCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAA						
GH419 →	C-G-T-GC-TTCTGCTTCTCTG-AACCATCCCGGCCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAA						
GH441 →	C-G-T-GC-TTCTGCTTCTCTG-AACCATCCCGGCCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAA						
GH403 →	C-G-T-GC-TTCTGCTTCTCTG-AACCATCCCGGCCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAA						
GH401 →	C-G-T-GC-TTCTGCTTCTCTG-AACCATCCCGGCCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAA						
GH443 →	C-G-T-GC-TTCTGCTTCTCTG-AACCATCCCGGCCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAA						
GH439 →	C-G-T-GC-TTCTGCTTCTCTG-AACCATCCCGGCCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAA						
GH442 →	C-G-T-GC-TTCTGCTTCTCTG-AACCATCCCGGCCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAA						
GH407 →	C-G-T-GC-TTCTGCTTCTCTG-AACCATCCCGGCCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAA						
GH430 →	C-G-T-GC-TTCTGCTTCTCTG-AACCATCCCGGCCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAA						
GH431 →	C-G-T-GC-TTCTGCTTCTCTG-AACCATCCCGGCCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAA						
GH404 →	C-G-T-GC-TTCTGCTTCTCTG-AACCATCCCGGCCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAA						
GH425 →	C-G-T-GC-TTCTGCTTCTCTG-AACCATCCCGGCCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAA						
GH459 →	C-G-T-GC-TTCTGCTTCTCTG-AACCATCCCGGCCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAA						
GH434 →	C-G-T-GC-TTCTGCTTCTCTG-AACCATCCCGGCCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAA						
GH405 →	C-G-T-GC-TTCTGCTTCTCTG-AACCATCCCGGCCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAA						
GH433 →	C-G-T-GC-TTCTGCTTCTCTG-AACCATCCCGGCCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAA						
GH428 →	C-G-T-GC-TTCTGCTTCTCTG-AACCATCCCGGCCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAA						
GH410 →	G-T-GC-TTCTGCTTCTCTG-AACCATCCCGGCCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAA						
GH423 →	G-T-GC-TTCTGCTTCTCTG-AACCATCCCGGCCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAA						
GH457 →	G-T-GC-TTCTGCTTCTCTG-AACCATCCCGGCCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAA						
GH411 →	G-T-GC-TTC-GCTTCTCTG-AACCATCCCGGCCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAA						
GH447 →	G-T-GC-TTC-GCTTCTCTG-AACCATCCCGGCCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAA						
GH446 →	G-T-GC-TTCTGCTTCTCTG-AACCATCCCGGCCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAA						
GH418 →	C-TTCT-CTTCTCTG-AACCATCCCGGCCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAA						
GH454 →	C-TTCT-CTTCTCTG-AACCATCCCGGCCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAA						
GH440 →	C-TTCTGCTTCTCTG-AACCATCCCGGCCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAA						
GH408 →	TT-TGCTT-TCTG-AACCATCCCGGCCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAGACAGAA						
GH444 →	TT-TGCTT-TCTG-AACCATCCCGGCCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAGACAGAA						
GH409 →	CTGCTTCTCTG-AACCATCCCGGCCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAA						
GH445 →	CTGCTTCTCTG-AACCATCCCGGCCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAA						
GH432 →	TTCTCT--AACCATCCCGGCCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAA						
GH448 →	TCTCT--AACCATCCCGGCCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAA						
GH412 →	TCTCT--AACCATCCCGGCCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAA						
GH437 →	TCTCTG-AACCATCCCGGCCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAA						



Lampiran 1. Lanjutan

	1470	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540
	GAAATCAGTGAG-TGRC AACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC							
Gordon →	GAAATCAGTGAG-TGGCAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC							
GH419 →	GAAATCAGTGAG-TGGCAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC							
GH441 →	GAAATCAGTGAG-TGGCAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC							
GH403 →	GAAATCAGTGAG-TGGCAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC							
GH401 →	GAAATCAGTGAG-TGGCAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC							
GH443 →	GAAATCAGTGAG-TGGCAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCATC							
GH439 →	GAAATCAGTGAG-TGGCAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC							
GH442 →	GAAATCAGTGAG-TGGCAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC							
GH407 →	GAAATCAGTGAG-TGGCAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCATC							
GH430 →	GAAATCAGTGAG-TGGCAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC							
GH431 →	GAAATCAGTGAG-TGGCAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC							
GH404 →	GAAATCAGTGAG-TGGCAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC							
GH425 →	GAAATCAGTGAG-TGGCAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC							
GH459 →	GAAATCAGTGAG-TGGCAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC							
GH434 →	GAAATCAGTGAG-TAAC AACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC							
GH405 →	GAAATCAGTGAG-TAAC AACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC							
GH433 →	GAAATCAGTGAG-TGRC AACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC							
GH428 →	GAAATCAGTGAG-TGRC AACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC							
GH410 →	GAAATCAGTGAG-TAAC AACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC							
GH423 →	GAAATCAGTGAG-TGGCAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC							
GH457 →	GAAATCAGTGAG-TGGCAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC							
GH411 →	GAAATCAGTGAG-TGGCAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC							
GH447 →	GAAATCAGTGAG-TGGCAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC							
GH446 →	GAAATCAGTGAG-TAAC AACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC							
GH418 →	GAAATCAGTGAG-TGGCAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC							
GH454 →	GAAATCAGTGAG-TGGCAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC							
GH440 →	GAAATCAGTGAG-TAAC AACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC							
GH408 →	GAAATCAGTGAGTAAC AACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC							
GH444 →	GAAATCAGTGAGTAAC AACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC							
GH409 →	GAAATCAGTGAG-TGRC AACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC							
GH445 →	GAAATCAGTGAG-TGRC AACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC							
GH432 →	GAAATCAGTGAG-TTRCAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC							
GH448 →	GAAATCAGTGAG-TAAC AACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC							
GH412 →	GAAATCAGTGAG-TAAC AACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC							
GH437 →	GAAATCAGTGAG-TGGCAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC							



Lampiran 1. Lanjutan

[illegible]

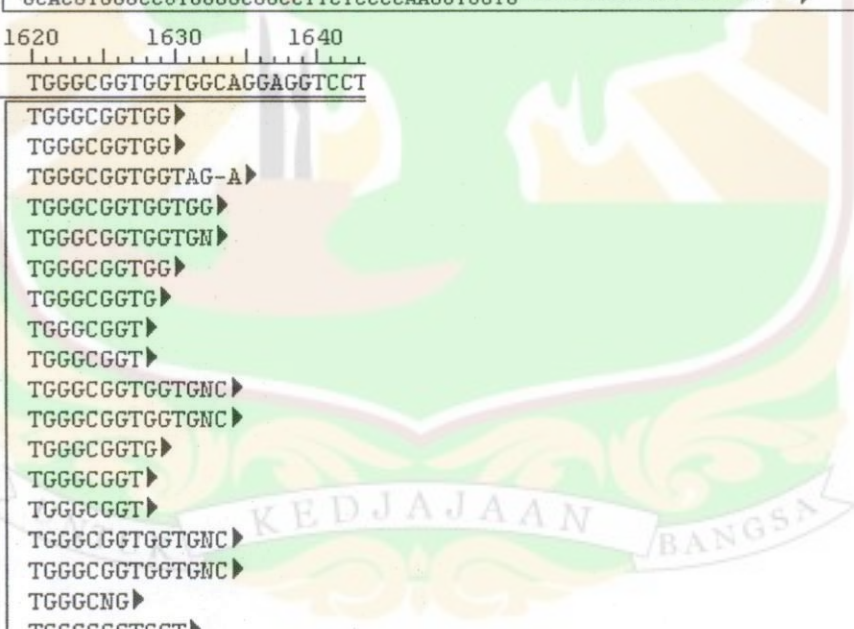
Lampiran 1. Lanjutan

	1610	1620	1630	1640
	AGGATGATGGTGGGCGGTGGTGGCAGGAGGTCC			
Gordon →	AGGATGATGGTGGGCGGTGGTGGCAGGAGGTCC			
GH419 →	AGGATGATGGTGGGCGGTGGTGN▶			
GH441 →	AGGATGATGGTGGGC▶			
GH403 →	AGGATGATGGTGGGCGGTGGT▶			
GH401 →	AGGATGATGGTGGGCGGTGGTGN▶			
GH443 →	AGGATGATGGTGG▶			
GH439 →	AGGATGATGGTGGGCGGTGG▶			
GH442 →	AGGATGATGGTGG▶			
GH407 →	AGGATGATGGTGG▶			
GH430 →	AGGATGATGGTGGGCGGTGGT▶			
GH431 →	AGGATGATGGTGGGCGGTGG▶			
GH404 →	AGGATGATGGTGGGCGGTGG▶			
GH425 →	AGGATGATGGTGGGCGGTGGTGG▶			
GH459 →	AGGATGATGGTGGGCGGTGGTGG▶			
GH434 →	AGGATGATGGTGGGCGGT▶			
GH405 →	AGGATGATGGTGGGCGGT▶			
GH433 →	AGGATGATGGTGGGCGGTGGT▶			
GH428 →	AGGATGATGGTGGGCGGTGG▶			
GH410 →	AGGATGATGGTGGGCGG▶			
GH423 →	AGGATGATGGTGGGCGGTGG▶			
GH457 →	AGGATGATGGTGGGCGGTGG▶			
GH411 →	AGGATGATGGTGGGCGGTGGT▶			
GH447 →	AGGATGATGGTGGGCGGTGGT▶			
GH446 →	AGGATGATGGTGGGCGG▶			
GH418 →	AGGATGATGGTGGGCGGTGGTGN▶			
GH454 →	AGGATGATGGTGGGCGGTGGTGG▶			
GH440 →	AGGATGATGGTGGGCGGTGG▶			
GH408 →	AGGATGATGGTGGGCG▶			
GH444 →	AGGATGATGGTGGGCG▶			
GH409 →	AGGATGATGGTGGGCG▶			
GH445 →	AGGATGATGGTGGGCG▶			
GH432 →	AGGATGATGGTGGGCGGTGGTGNC▶			
GH448 →	AGGATGATGGTGGGCGGTGGTGG▶			
GH412 →	AGGATGATGGTGGGCGGTGGTGG▶			
GH437 →	AGGATGATGGTGGGCGGTGG▶			

Lampiran 1. Lanjutan

	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	1480
	CC-G-T-GC-TTCTGCTTCTCTG-AACCATCCCGGCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAAATCAGTGAG-							
GH437 →				ITCTCTG-AACCATCCCGGCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAAATCAGTGAG-				
GH406 →				ITCTCTG-AACCATCCCGGCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAAATCAGTGAG-				
GH421 →				ICTG-AA-CATCCCGGCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CANAAATCANTGAG-				
GH456 →				ICTG-AA-CATCCCGGCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAAATCAGTGAG-				
GH427 →				ICTG-AACCATCCCGGCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAAATCAGTGAG-				
GH426 →				IG-AA-CATCCCGGCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAAATCAGTGAG-				
GH429 →				IG-AACCATCCCGGCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAAATCAGTGAG-				
GH449 →				IG-AACCATCCCGGCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAAATCAGTGAG-				
GH413 →				IG-AACCATCCCGGCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAAATCAGTGAG-				
GH414 →				IACCATCCCGGCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAAATCAGTGAG-				
GH450 →				IACCATCCCGGCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAAATCAGTGAG-				
GH438 →				IACCATCCCGGCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAAATCAGTGAG-				
GH415 →				ICCATCCCGGCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAAATCAGTGAG-				
GH451 →				ICCATCCCGGCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAAATCAGTGAG-				
GH422 →				ICCATCCCGGCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAAATCAGTGAG-				
GH402 →				ICCATCCCGGCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAAATCAGTGAG-				
GH435 →				IATCCCGGCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CANAAATCAGTGAG-				
GH420 →				IATCCCGGCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAAATCAGTGAG-				
GH455 →				IATCCCGGCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAAATCAGTGAG-				
GH424 →				IGCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAAATCAGTGAG-				
GH458 →				IGCCCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAAATCAGTGAG-				
GH452 →				ICCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAAATCAGTGAG-				
GH416 →				ICCCACGGGCAAGAATGAGGCCAG-CAGAAATCAGTGAG-				
GH453 →								IGCCACACAAAAATCAGTGAGG
	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540	1550
	AG-TGRC AACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC-TCTCCGCAC							
GH437 →	AG-TGGCAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC-TCTCCGCAC							
GH406 →	AG-TGGCAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC-TCTCCGCAC							
GH421 →	AG-TGNCAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC-TCTCCGCAC							
GH456 →	AG-TGGCAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC-TCTCCGCAC							
GH427 →	AG-TAACCAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC-TCTCCGCAC							
GH426 →	AG-TRRCAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC-TCTCCGCAC							
GH429 →	AG-TGGCAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC-TCTCCGCAC							
GH449 →	AG-TAACCAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC-TCTCCGCAC							
GH413 →	AG-TAACCAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC-TCTCCGCAC							
GH414 →	AG-TRRCAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC-TCTCCGCAC							
GH450 →	AG-TRRCAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC-TCTCCGCAC							
GH438 →	AG-TAACCAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC-TCTCCGCAC							
GH415 →	AG-TGGCAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC-TCTCCGCAC							
GH451 →	AG-TGGCAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC-TCTCCGCAC							
GH422 →	AG-TAACCAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC-TCTCCGCAC							
GH402 →	AG-TAACCAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC-TCTCCGCAC							
GH435 →	AG-TGGCAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC-TCTCCGCAC							
GH420 →	AG-TRACAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC-TCTCCGCAC							
GH455 →	AG-TRACAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC-TCTCCGCAC							
GH424 →	AG-TAANAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC-TCTCCGCAC							
GH458 →	AG-TANNAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC-TCTCCGCAC							
GH452 →	AG-TGGCAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC-TCTCCGCAC							
GH416 →	AG-TGGCAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGG-ACCTCCTTCATCC-TAAG-TAGGCTGCCCCAGC-TCTCCGCAC							
GH453 →	AGGTGGCAACCTCGGACCGAGGAGCAGGGGACCTCCTTCATCCATAATATAGGCTGCCCCAGCCTCTCCGCAC							

Lampiran 1. Lanjutan

	1550	1560	1570	1580	1590	1600	1610	1620
	GCAC-TGGGCC-TGGGGCGGCCCTTCTCCCCGAGGTGGCGGAGGTTGTTGGATGGCAGTGGAGGATGATGGTGG							
GH437 →	GCAC-TGGGCC-TGGGGCGGCCCTTCTCCCCGAGGTGGCGGAGGTTGTTGGATGGCAGTGGAGGATGATGGTGG							
GH406 →	GCAC-TGGGCC-TGGGGCGGCCCTTCTCCCCGAGGTGGCGGAGGTTGTTGGATGGCAGTGGAGGATGATGGTGG							
GH421 →	GCAC-TGGGCC-TGGGGCGGCCCTTCTCCCCGAGGTGGCGGAGGTTGTTGGATGGCAGTGGAGGATGATGGTGG							
GH456 →	GCAC-TGGGCC-TGGGGCGGCCCTTCTCCCCGAGGTGGCGGAGGTTGTTGGATGGCAGTGGAGGATGATGGTGG							
GH427 →	GCAC-TGGGCC-TGGGGCGGCCCTTCTCCCCGAGGTGGCGGAGGTTGTTGGATGGCAGTGGAGGATGATGGTGG							
GH426 →	GCAC-TGGGCC-TGGGGCGGCCCTTCTCCCCGAGGTGGCGGAGGTTGTTGGATGGCAGTGGAGGATGATGGTGG							
GH429 →	GCAC-TGGGCC-TGGGGCGGCCCTTCTCCCCGAGGTGGCGGAGGTTGTTGGATGGCAGTGGAGGATGATGGTGG							
GH449 →	GCAC-TGGGCC-TGGGGCGGCCCTTCTCCCCGAGGTGGCGGAGGTTGTTGGATGGCAGTGGAGGATGATGGTGG							
GH413 →	GCAC-TGGGCC-TGGGGCGGCCCTTCTCCCCGAGGTGGCGGAGGTTGTTGGATGGCAGTGGAGGATGATGGTGG							
GH414 →	GCAC-TGGGCC-TGGGGCGGCCCTTCTCCCCGAGGTGGCGGAGGTTGTTGGATGGCAGTGGAGGATGATGGTGG							
GH450 →	GCAC-TGGGCC-TGGGGCGGCCCTTCTCCCCGAGGTGGCGGAGGTTGTTGGATGGCAGTGGAGGATGATGGTGG							
GH438 →	GCAC-TGGGCC-TGGGGCGGCCCTTCTCCCCGAGGTGGCGGAGGTTGTTGGATGGCAGTGGAGGATGATGGTGG							
GH415 →	GCAC-TGGGCC-TGGGGCGGCCCTTCTCCCCGAGGTGGCGGAGGTTGTTGGATGGCAGTGGAGGATGATGGTGG							
GH451 →	GCAC-TGGGCC-TGGGGCGGCCCTTCTCCCCGAGGTGGCGGAGGTTGTTGGATGGCAGTGGAGGATGATGGTGG							
GH422 →	GCAC-TGGGCC-TGGGGCGGCCCTTCTCCCCGAGGTGGCGGAGGTTGTTGGATGGCAGTGGAGGATGATGGTGG							
GH402 →	GCAC-TGGGCC-TGGGGCGGCCCTTCTCCCCGAGGTGGCGGAGGTTGTTGGATGGCAGTGGAGGATGATGGTGG							
GH435 →	NCAC-TGGGCC-TGGGGCGGCCCTTCTNCCCCANGTGGCGGANGTTGTTNGATGGCAGTGGANGATGATGGTGG							
GH420 →	GCAC-TGGGCC-TGGGGCGGCCCTTCTCCCCGAGGTGGCGGAGGTTGTTGGATGGCAGTGGAGGATGATGGTGG							
GH455 →	GCAC-TGGGCC-TGGGGCGGCCCTTCTCCCCGAGGTGGCGGAGGTTGTTGGATGGCAGTGGAGGATGATGGTGG							
GH424 →	GCAC-TGGGCC-TGGGGCGGCCCTTCTCCCCGAGGTGGCGGAGGTTGTTGGATGGCAGTGGAGGATGATGGTGG							
GH458 →	GCAC-TGGGCC-TGGGGCGGCCCTTCTCCCCGAGGTGGCGGAGGTTGTTGGATGGCAGTGGAGGATGATGGTGG							
GH452 →	GCAC-TGGGCC-TGGGGCGGCCCTTCTCCCCGAGGTGGCGGAGGTTGTTGGATGGCAGTGGAGGATGATGGTGG							
GH416 →	GCAC-TGGGCC-TGGGGCGGCCCTTCTCCCCGAGGTGGCGGAGGTTGTTGGATGGCAGTGGAGGATGATGGTGG							
GH453 →	GCACGTGGGCCGTGGGGCGGCCCTTCTCCCCAAGGTGGTG-----▶							
	1620	1630	1640					
	TGGGCGGTGGTGGCAGGAGGTCTT							
GH437 →	TGGGCGGTGG▶							
GH406 →	TGGGCGGTGG▶							
GH421 →	TGGGCGGTGGTAG-A▶							
GH456 →	TGGGCGGTGGTGG▶							
GH427 →	TGGGCGGTGGTGG▶							
GH426 →	TGGGCGGTGG▶							
GH429 →	TGGGCGGTGG▶							
GH449 →	TGGGCGGT▶							
GH413 →	TGGGCGGT▶							
GH414 →	TGGGCGGTGGTGNC▶							
GH450 →	TGGGCGGTGGTGNC▶							
GH438 →	TGGGCGGTGG▶							
GH415 →	TGGGCGGT▶							
GH451 →	TGGGCGGT▶							
GH422 →	TGGGCGGTGGTGNC▶							
GH402 →	TGGGCGGTGGTGNC▶							
GH435 →	TGGGCNG▶							
GH420 →	TGGGCGGTGGT▶							
GH455 →	TGGGCGGTGGT▶							
GH424 →	TGGGCGGTGG▶							
GH458 →	TGGGCGGTGG▶							
GH452 →	TGGG▶							
GH416 →	TGGG▶							
GH453 →	-----▶							

Lampiran 2. Sekuen oligonukleotida gen GH sebahagian daerah exon 4 dan sebahagian intron 4 hasil amplifikasi menggunakan pasangan primer GH5L dan GH5R

	1740	1750	1760	1770	1780	1790	1800	1810
	C-GTcGTGGCtTGGG-CCCTGCAGTTCCTCAGCAGAGTCTTCACCAACAG-CTTGGTGTtTGGCACCTCGGACC							
Gordon →	CAGTCGTGGCTTGGGCCCTGCAGTTCCTCAGCAGAGTCTTCACCAACAG-CTTGGTGTtTGGCACCTCGGACC							
GH5_09 →	C-GT-GTGGCTTGGG-CCCTGCAGTTCCTCAGCAGAGTCTTCACCAACAG-CTTGGTGTtTGGCACCTCGGACC							
GH5_54 →	C-GT-GTGGCTTGGG-CCCTGCAGTTCCTCAGCAGAGTCTTCACCAACAG-CTTGGTGTtTGGCACCTCGGACC							
GH5_04 →	GTCGTGGCTTGGG-CCCTGCAGTTCCTCAGCAGAGTCTTCACCAACAG-CTTGGTGTtTGGCACCTCGGACC							
GH5_17 →	GTCGTGGCTTGGG-CCCTGCAGTTCCTCAGCAGAGTCTTCACCAACAG-CTTGGTGTtTGGCACCTCGGACC							
GH5_03 →	GTCGTGGCTTGGG-CCCTGCAGTTCCTCAGCAGAGTCTTCACCAACAG-CTTGGTGTtTGGCACCTCGGACC							
GH5_08 →	GTCGTGGCTTGGG-CCCTGCAGTTCCTCAGCAGAGTCTTCACCAACAG-CTTGGTGTtTGGCACCTCGGACC							
GH5_22 →	C-GTGGCTTGGGCCCTGCAGTTCCTCAGCAGAGTCTTCACCAACAG-CTTGGTGTtTGGCACCTCGGACC							
GH5_53 →	C-GTGGC-TGGGCCCTGCAGTTCCTCAGCAGAGTCTTCACCAACAG-CTTGGTGTtTGGCACCTCGGACC							
GH5_02 →	TCG-GGC-TGGG-CCCTGCAGTTCCTCAGCAGAGTCTTCACCAACAG-CTTGGTGTtTGGCACCTCGGACC							
GH5_07 →	TCG-GGC-TGGG-CCCTGCAGTTCCTCAGCAGAGTCTTCACCAACAG-CTTGGTGTtTGGCACCTCGGACC							
GH5_05 →	CGTGGC-TGGG-CCCTGCAGTTCCTCAGCAGAGTCTTCACCAACAG-CTTGGTGTtTGGCACCTCGGACC							
GH5_57 →	TGGCT-GGGCCCTGCAGTTCCTCAGCAGAGTCTTCACCAACAGCCTTGGTGTtTGGCACCTCGGACC							
GH5_18 →	TGGC-TGGG-CCCTGCAGTTCCTCAGCAGAGTCTTCACCAACAG-CTTGGTGTtTGGCACCTCGGACC							
GH5_51 →	GGC-TGGG-CCCTGCAGTTCCTCAGCAGAGTCTTCACCAACAG-CTTGGTGTtTGGCACCTCGGACC							
GH5_19 →	GGC-TGGG-CCCTGCAGTTCCTCAGCAGAGTCTTCACCAACAG-CTTGGTGTtTGGCACCTCGGACC							
GH5_21 →	GC-TGGG-CCCTGCAGTTCCTCAGCAGAGTCTTCACCAACAG-CTTGGTGTtTGGCACCTCGGACC							
GH5_52 →	GC-TGGG-CCCTGCAGTTCCTCAGCAGAGTCTTCACCAACAG-CTTGGTGTtTGGCACCTCGGACC							
GH5_20 →	CTTGGGCCCTGCAGTTCCTCAGCAGAGTCTTCACCAACAG-CTTGGTGTtTGGCACCTCGGACC							
GH5_10 →	CTTGGGCCCTGCAGTTCCTCAGCAGAGTCTTCACCAACAG-CTTGGTGTtTGGCACCTCGGACC							
GH5_16 →	CT-GGGCCCTGCAGTTCCTCAGCAGAGTCTTCACCAACAG-CTTGGTGTtTGGCACCTCGGACC							
GH5_12 →	CT-GGGCCCTGCAGTTCCTCAGCAGAGTCTTCACCAACAG-CTTGGTGTtTGGCACCTCGGACC							
GH5_29 →	GGG-CCCTGCAGTTCCTCAGCAGAGTCTTCACCAACAG-CTTGGTGTtTGGCACCTCGGACC							
GH5_60 →	GGG-CCCTGCAGTTCCTCAGCAGAGTCTTCACCAACAG-CTTGGTGTtTGGCACCTCGGACC							
GH5_56 →	GGG-CCCTGCAGTTCCTCAGCAGAGTCTTCACCAACAG-CTTGGTGTtTGGCACCTCGGACC							
GH5_55 →	GGG-CCCTGCAGTTCCTCAGCAGAGTCTTCACCAACAG-CTTGGTGTtTGGCACCTCGGACC							
GH5_14 →	GGG-CCCTGCAGTTCCTCAGCAGAGTCTTCACCAACAG-CTTGGTGTtTGGCACCTCGGACC							
GH5_15 →	GGG-CCCTGCAGTTCCTCAGCAGAGTCTTCACCAACAG-CTTGGTGTtTGGCACCTCGGACC							
GH5_11 →	GG-CCCTGCAGTTCCTCAGCAGAGTCTTCACCAACAG-CTTGGTGTtTGGCACCTCGGACC							
GH5_13 →	GG-CCCTGCAGTTCCTCAGCAGAGTCTTCACCAACAG-CTTGGTGTtTGGCACCTCGGACC							
GH5_36 →	GCAGTTCCTCAGCAGAGTCTTCACCAACAG-CTTGGTGTtTGGCACCTCGGACC							
GH5_46 →	GTCTTCACCAACAG-CTTGGTGTtTGGCACCTCGGACC							
GH5_39 →	TCTTCACCAACAG-CTTGGTGTtTGGCACCTCGGACC							
GH5_48 →	TCTTCACCAACAG-CTTGGTGTtTGGCACCTCGGACC							
GH5_25 →	TCTTCACCAACAG-CTTGGTGTtTGGCACCTCGGACC							



Lampiran 2. Lanjutan

[illegible]

Lampiran 2. Lanjutan

	1880	1890	1900	1910	1920	1930	1940	1950
	GTGGGTCCCTTCCATGCTGGGGGCCATGCCCGCCCTSTCCTGGCTTAGCCAGGAGAATGCACGTGGGCTGGGG							
Gordon →	GTGGGTCCCTTCCATG-TGGGGGCCATGCCCGCCCTCTCCTGGCTTAGCCAGGAGAATGCACGTGGGCTGGGG							
GH5_09 →	GTGGGTCCCTTCCATGCTGGGGGCCATGCCCGCCCTNTCCTGGCTTAGCCAGGAGAATGCACGTGGGCTKGGG							
GH5_54 →	GTGGGTCCCTTCCATGCTGGGGGCCATGCCCGCCCTNTCCTGGCTTAGCCAGGAGAATGCACGTGGGCTKGGG							
GH5_04 →	GTGGGTCCCTTCCATGCTGGGGGCCATGCCCGCCCTCTCCTGGCTTAGCCAGGAGAATGCACGTGGGCTGGGG							
GH5_17 →	GTGGGTCCCTTCCATGCTGGGGGCCATGCCCGCCCTGTCTGGCTTAGCCAGGAGAATGCACGTGGGCTGGGG							
GH5_03 →	GTGGGTCCCTTCCATGCTGGGGGCCATGCCCGCCCTCTCCTGGCTTAGCCAGGAGAATGCACGTGGGCTGGGG							
GH5_08 →	GTGGGTCCCTTCCATGCTGGGGGCCATGCCCGCCCTCTCCTGGCTTAGCCAGGAGAATGCACGTGGGCTKGGG							
GH5_22 →	GTGGGTCCCTTCCATGCTGGGGGCCATGCCCGCCCTCTCCTGGCTTAGCCAGGAGAATGCACGTGGGCTGGGG							
GH5_53 →	GTGGGTCCCTTCCATGCTGGGGGCCATGCCCGCCCTCTCCTGGCTTAGCCAGGAGAATGCACGTGGGCTGGGG							
GH5_02 →	GTGGGTCCCTTCCATGCTGGGGGCCATGCCCGCCCTGTCTGGCTTAGCCAGGAGAATGCACGTGGGCTGGGG							
GH5_07 →	GTGGGTCCCTTCCATGCTGGGGGCCATGCCCGCCCTCTCCTGGCTTAGCCAGGAGAATGCACGTGGGCTGGGG							
GH5_05 →	GTGGGTCCCTTCCATGCTGGGGGCCATGCCCGCCCTGTCTGGCTTAGCCAGGAGAATGCACGTGGGCTGGGG							
GH5_57 →	GTGGGTCCCTTCCATGCTGGGGGCCATGCCCGCCCTCTCCTGGCTTAGCCAGGAGAATGCACGTGGGCTGGGG							
GH5_18 →	GTGGGTCCCTTCCATGCTGGGGGCCATGCCCGCCCTSTCCTGGCTTAGCCAGGAGAATGCACGTGGGCTGGGG							
GH5_51 →	GTGGGTCCCTTCCATGCTGGGGGCCATGCCCGCCCTSTCCTGGCTTAGCCAGGAGAATGCACGTGGGCTGGGG							
GH5_19 →	GTGGGTCCCTTCCATGCTGGGGGCCATGCCCGCCCTGTCTGGCTTAGCCAGGAGAATGCACGTGGGCTGGGG							
GH5_21 →	GTGGGTCCCTTCCATGCTGGGGGCCATGCCCGCCCTGTCTGGCTTAGCCAGGAGAATGCACGTGGGCTGGGG							
GH5_52 →	GTGGGTCCCTTCCATGCTGGGGGCCATGCCCGCCCTGTCTGGCTTAGCCAGGAGAATGCACGTGGGCTGGGG							
GH5_20 →	GTGGGTCCCTTCCATGCTGGGGGCCATGCCCGCCCTSTCCTGGCTTAGCCAGGAGAATGCACGTGGGCTGGGG							
GH5_10 →	GTGGGTCCCTTCCATGCTGGGGGCCATGCCCGCCCTGTCTGGCTTAGCCAGGAGAATGCACGTGGGCTGGGG							
GH5_16 →	GTGGGTCCCTTCCATGCTGGGGGCCATGCCCGCCCTCTCCTGGCTTAGCCAGGAGAATGCACGTGGGCTGGGG							
GH5_12 →	GTGGGTCCCTTCCATGCTGGGGGCCATGCCCGCCCTGTCTGGCTTAGCCAGGAGAATGCACGTGGGCTGGGG							
GH5_29 →	GTGGGTCCCTTCCATGCTGGGGGCCATGCCCGCCCTGTCTGGCTTAGCCAGGAGAATGCACGTGGGCTGGGG							
GH5_60 →	GTGGGTCCCTTCCATGCTGGGGGCCATGCCCGCCCTSTCCTGGCTTAGCCAGGAGAATGCACGTGGGCTGGGG							
GH5_56 →	GTGGGTCCCTTCCATGCTGGGGGCCATGCCCGCCCTCTCCTGGCTTAGCCAGGAGAATGCACGTGGGCTGGGG							
GH5_55 →	GTGGGTCCCTTCCATGCTGGGGGCCATGCCCGCCCTGTCTGGCTTAGCCAGGAGAATGCACGTGGGCTGGGG							
GH5_14 →	GTGGGTCCCTTCCATGCTGGGGGCCATGCCCGCCCTCTCCTGGCTTAGCCAGGAGAATGCACGTGGGCTKGGG							
GH5_15 →	GTGGGTCCCTTCCATGCTGGGGGCCATGCCCGCCCTCTCCTGGCTTAGCCAGGAGAATGCACGTGGGCTGGGG							
GH5_11 →	GTGGGTCCCTTCCATGCTGGGGGCCATGCCCGCCCTGTCTGGCTTAGCCAGGAGAATGCACGTGGGCTGGGG							
GH5_13 →	GTGGGTCCCTTCCATGCTGGGGGCCATGCCCGCCCTCTCCTGGCTTAGCCAGGAGAATGCACGTGGGCTGGGG							
GH5_36 →	GTGGGTCCCTTCCATGCTGGGGGCCATGCCCGCCCTGTCTGGCTTAGCCAGGAGAATGCACGTGGGCTGGGG							
GH5_46 →	GTGGGTCCCTTCCATGCTGGGGGCCATGCCCGCCCTNTCCTGGCTTAGCCAGGAGAATGCACGTGGGCTGGGG							
GH5_39 →	GTGGGTCCCTTCCATGCTGGGGGCCATGCCCGCCCTGTCTGGCTTAGCCAGGAGAATGCACGTGGGCTGGGG							
GH5_48 →	GTGGGTCCCTTCCATGCTGGGGGCCATGCCCGCCCTNTCCTGGCTTAGCCAGGAGAATGCACGTGGGCTGGGG							
GH5_25 →	GTGGGTCCCTTCCATGCTGGGGGCCATGCCCGCCCTCTCCTGGCTTAGCCAGGAGAATGCACGTGGGCTGGGG							



Lampiran 2. Lanjutan

	2020	2030	2040	2050	2060
	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTAGGGGA				
Gordon →	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTAGGGGA				
GH5_09 →	TTTTGAARCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_54 →	TTTTGAARCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_04 →	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_17 →	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_03 →	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_08 →	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_22 →	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_53 →	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_02 →	TTTTGAAGCCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_07 →	TTTTGAAGCCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_05 →	TTTTGAAGCCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_57 →	TTTTGAAGCCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_18 →	TTTTGAAGCCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_51 →	TTTTGAAGCCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_19 →	TTTTGAAGCCTCCTTCCTCGCCCTTCTTAAGC▶				
GH5_21 →	TTTTGAAGCCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_52 →	TTTTGAAGCCTCCTTCCTCGCCCTTCTTAAGC▶				
GH5_20 →	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_10 →	TTTTGAAGCCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_16 →	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_12 →	TTTTGAAGCCTCCTTCCTCNCCTTCTCCAANCCT▶				
GH5_29 →	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_60 →	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_56 →	TTTTGAAACCTCCTTCCTCNCCTTCTCCAANCCT▶				
GH5_55 →	TTTTGAAGCCTCCTTCCTCNCCTTCTCCAANCCT▶				
GH5_14 →	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAANCNT▶				
GH5_15 →	-----▶				
GH5_11 →	TTTTGAAGCCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_13 →	TTTTGAAACCTCCTTCCTCNCCTTCTCCAANCCT▶				
GH5_36 →	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_46 →	-----▶				
GH5_39 →	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_48 →	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_25 →	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				

Lampiran 2. Lanjutan

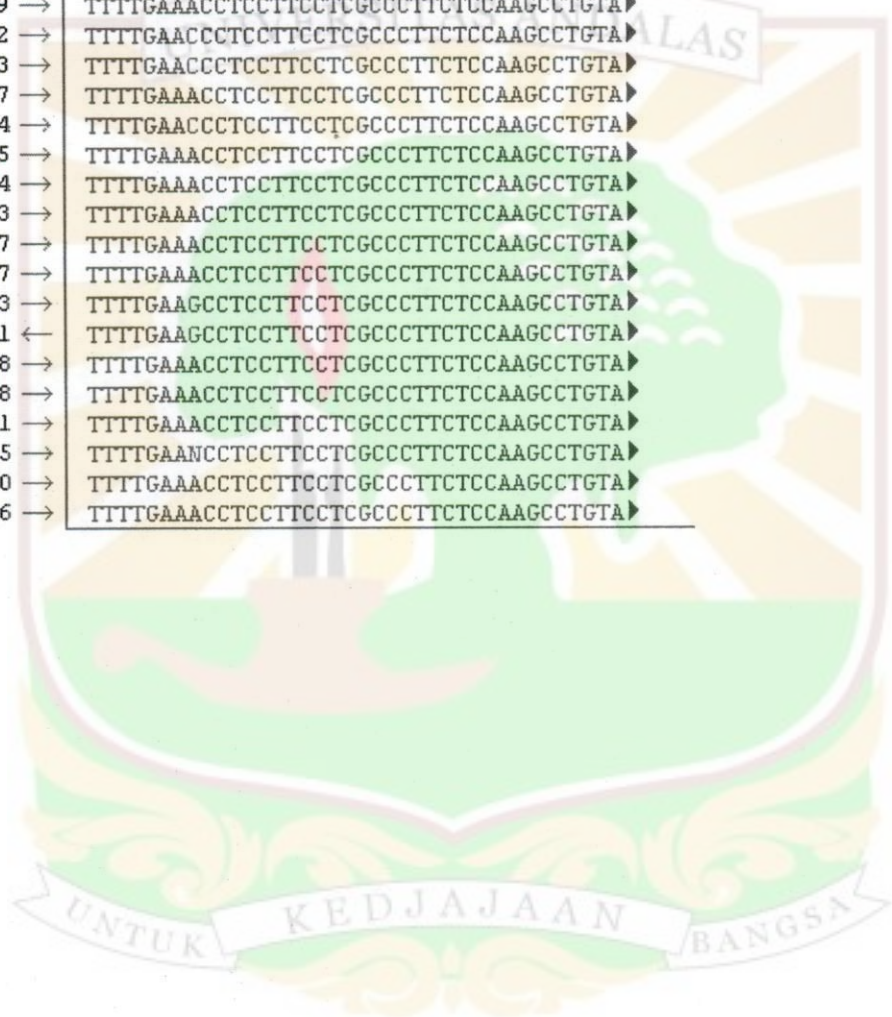
	1740	1750	1760	1770	1780	1790	1800	1810
	C-GTcGTGGCtTGGG-CCCTGCAGTTCCTCAGCAGAGTCTTCACCAACAG-CTTGGTGTtTGGCACCTCGGACCI							
GH5_44 →								ICTCGGTGTTTGGCACCTCGGACCI
GH5_41 →								ITGGTGTtTGGCACCTCGGACCI
GH5_40 →								ITGGTGTtTGGCACCTCGGACCI
GH5_42 →								ITGGTGTtTGGCACCTCGGACCI
GH5_28 →								ITGGTGTtTGGCACCTCGGACCI
GH5_30 →								ITGGTGTtTGGCACCTCGGACCI
GH5_49 →								IGGTGTtTGGCACCTCGGACCI
GH5_59 →								ITGTtTGGCACCTCGGACCI
GH5_32 →								ICACCTCGGACCI
GH5_33 →								IACCTCGGACCI
GH5_47 →								ICGGACCI
GH5_24 →								IGACCI
GH5_35 →								
GH5_34 →								
GH5_43 →								
GH5_37 →								
GH5_27 →								
GH5_23 →								
GH5_01 ←								
GH5_58 →								
GH5_38 →								
GH5_31 →								
GH5_45 →								
GH5_50 →								
GH5_26 →								
	1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1880
	ACCGTGTCTATGAGAAGCTGAAGGACCTGGAGGAAGGCATCCTGGCCCTGATGCGGGTGGGGATGGCGTTGTG							
GH5_44 →	ACCGTGTCTATGAGAAGCTGAAGGACCTGGAGGAANGCNCCTGGCCCTGATGCGGGTGGGGATGGCGTTGTG							
GH5_41 →	ACCGTGTCTATGAGAAGCTGAAGGACCTGGAGGAAGGCATCCTGGCCCTGATGCGGGTGGGGATGGCGTTGTG							
GH5_40 →	ACCGTGTCTATGAGAAGCTGAAGGACCTGGAGGAAGGCATCCTGGCCCTGATGCGGGTGGGGATGGCGTTGTG							
GH5_42 →	ACCGTGTCTATGAGAAGCTGAAGGACCTGGAGGAAGGCATCCTGGCCCTGATGCGGGTGGGGATGGCGTTGTG							
GH5_28 →	ACCGTGTCTATGAGAAGCTGAAGGACCTGGAGGAAGGCATCCTGGCCCTGATGCGGGTGGGGATGGCGTTGTG							
GH5_30 →	ACCGTGTCTATGAGAAGCTGAAGGACCTGGAGGAANGCANCCTGGCCCTGATGCGGGTGGGGATGGCGTTGTG							
GH5_49 →	ACCGTGTCTATGAGAAGCTGAAGGACCTGGAGGAAGGCATCCTGGCCCTGATGCGGGTGGGGATGGCGTTGTG							
GH5_59 →	ACCGTGTCTATGAGAAGCTGAAGGACCTGGAGGAAGGCATCCTGGCCCTGATGCGGGTGGGGATGGCGTTGTG							
GH5_32 →	ACCGTGTCTATGAGAAGCTGAAGGACCTGGAGGAAGGCATCCTGGCCCTGATGCGGGTGGGGATGGCGTTGTG							
GH5_33 →	ACCGTGTCTATGAGAAGCTGAAGGACCTGGAGGAAGGCATCCTGGCCCTGATGCGGGTGGGGATGGCGTTGTG							
GH5_47 →	ACCGTGTCTATGAGAAGCTGAAGGACCTGGAGGAANGGCATCCTGGCCCTGATGCGGGTGGGGATGGCGTTGTG							
GH5_24 →	ACCGTGTCTATGAGAAGCTGAAGGACCTGGAGGAAGGCATCCTGGCCCTGATGCGGGTGGGGATGGCGTTGTG							
GH5_35 →	I AANCTGAAGGACCTGGAGGAANGCATCCTGGCCCTGATGCGGGTGGGGATGGCGTTGTG							
GH5_34 →	I CTGAAGGACCTGGAGGAANGCATCCTGGCCCTGATGCGGGTGGGGATGGCGTTGTG							
GH5_43 →	I CTGAAGGACCTGGAGGAANGCATCCTGGCCCTGATGCGGGTGGGGATGGCGTTGTG							
GH5_37 →	I GAAGGACCTGGAGGAAGGCATCCTGGCCCTGATGCGGGTGGGGATGGCGTTGTG							
GH5_27 →	I GAAGGACCTGGAGGAAGGCATCCTGGCCCTGATGCGGGTGGGGATGGCGTTGTG							
GH5_23 →	I GAAGGACCTGGAGGAAGGCATCCTGGCCCTGATGCGGGTGGGGATGGCGTTGTG							
GH5_01 ←	I GAAGGACCTGGAGGAAGGCATCCTGGCCCTGATGCGGGTGGGGATGGCGTTGTG							
GH5_58 →	I GAAGGACCTGGAGGAAGGCATCCTGGCCCTGATGCGGGTGGGGATGGCGTTGTG							
GH5_38 →	I GAAGGACCTGGAGGAAGGCATCCTGGCCCTGATGCGGGTGGGGATGGCGTTGTG							
GH5_31 →	I GAAGGACCTGGAGGAAGGCATCCTGGCCCTGATGCGGGTGGGGATGGCGTTGTG							
GH5_45 →	I AAGGACCTGGAGGAAGGCATCCTGGCCCTGATGCGGGTGGGGATGGCGTTGTG							
GH5_50 →	I GCATCCTGGCCCTGATGCGGGTGGGGATGGCGTTGTG							
GH5_26 →	I GGCCTGATGCGGGTGGGGATGGCGTTGTG							

Lampiran 2. Lanjutan

[illegible]

Lampiran 2. Lanjutan

	2020	2030	2040	2050	2060
	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTAGGGGA				
GH5_44 →	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAANCCTGTA▶				
GH5_41 →	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_40 →	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_42 →	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_28 →	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAACCTGTA▶				
GH5_30 →	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAANCCTGTA▶				
GH5_49 →	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAANCCTGTA▶				
GH5_59 →	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_32 →	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_33 →	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_47 →	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_24 →	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_35 →	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_34 →	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_43 →	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_37 →	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_27 →	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_23 →	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_01 ←	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_58 →	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_38 →	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_31 →	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_45 →	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_50 →	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				
GH5_26 →	TTTTGAAACCTCCTTCCTCGCCCTTCTCCAAGCCTGTA▶				



Lampiran 3. Sekuen oligonukleotida gen GH sebahagian daerah intron 4 dan exon 5 hasil amplifikasi menggunakan pasangan primer GH6L dan GH6R

	2060	2070	2080	2090	2100	2110	2120	2130
	GAGGGTGAAAAATGGAGCGGGCAGGAGGGAGCTGCTCCTGAGGGCCCTTCGGCCTCTCTGTCTCTCCCTCCCTI							
Gordon →	GAGGGTGAAAAATGGAGCGGGCAGGAGGGAGCTGCTCCTGAGGGCCCTTCGGCCTCTCTGTCTCTCCCTCCCTI							
GH6_28 →	GAGGGTGAAAAATGGAGCGGGCAGGAGGGAGCTGCTCCTGAGGGCCCTTCGGCCTCTCTGTCTCTCCCTCCCTI							
GH6_27 →	GAGGGTGAAAAATGGAGCGGGCAGGAGGGAGCTGCTCCTGAGGGCCCTTCGGCCTCTCTGTCTCTCCCTCCCTI							
GH6_41 →	GAGGGTGAAAAATGGAGCGGGCAGGAGGGAGCTGCTCCTGAGGGCCCTTCGGCCTCTCTGTCTCTCCCTCCCTI							
GH6_20 →	GAGGGTGAAAAATGGAGCGGGCAGGAGGGAGCTGCTCCTGAGGGCCCTTCGGCCTCTCTGTCTCTCCCTCCCTI							
GH6_31 →	GAGGGTGAAAAATGGAGCGGGCAGGAGGGAGCTGCTCCTGAGGGCCCTTCGGCCTCTCTGTCTCTCCCTCCCTI							
GH6_30 →	GAGGGTGAAAAATGGAGCGGGCAGGAGGGAGCTGCTCCTGAGGGCCCTTCGGCCTCTCTGTCTCTCCCTCCCTI							
GH6_44 →	GAGGGTGAAAAATGGAGCGGGCAGGAGGGAGCTGCTCCTGAGGGCCCTTCGGCCTCTCTGTCTCTCCCTCCCTI							
GH6_19 →	GAGGGTGAAAAATGGAGCGGGCAGGAGGGAGCTGCTCCTGAGGGCCCTTCGGCCTCTCTGTCTCTCCCTCCCTI							
GH6_15 →	GAGGGTGAAAAATGGAGCGGGCAGGAGGGAGCTGCTCCTGAGGGCCCTTCGGCCTCTCTGTCTCTCCCTCCCTI							
GH6_04 →	GAGGGTGAAAAATGGAGCGGGCAGGAGGGAGCTGCTCCTGAGGGCCCTTCGGCCTCTCTGTCTCTCCCTCCCTI							
GH6_18 →	GAGGGTGAAAAATGGAGCGGGCAGGAGGGAGCTGCTCCTGAGGGCCCTTCGGCCTCTCTGTCTCTCCCTCCCTI							
GH6_13 →	GAGGGTGAAAAATGGAGCGGGCAGGAGGGAGCTGCTCCTGAGGGCCCTTCGGCCTCTCTGTCTCTCCCTCCCTI							
GH6_10 →	GAGGGTGAAAAATGGAGCGGGCAGGAGGGAGCTGCTCCTGAGGGCCCTTCGGCCTCTCTGTCTCTCCCTCCCTI							
GH6_03 →	GAGGGTGAAAAATGGAGCGGGCAGGAGGGAGCTGCTCCTGAGGGCCCTTCGGCCTCTCTGTCTCTCCCTCCCTI							
GH6_53 →	GAGGGTGAAAAATGGAGCGGGCAGGAGGGAGCTGCTCCTGAGGGCCCTTCGGCCTCTCTGTCTCTCCCTCCCTI							
GH6_17 →	GAGGGTGAAAAATGGAGC GGG CAGGAGGGAGCTGCTCCTGAGGGCCCTTCGGCCTCTCTGTCTCTCCCTCCCTI							
GH6_43 →	GAGGGTGAAAAATGGAGC GGG CAGGAGGGAGCTGCTCCTGAGGGCCCTTCGGCCTCTCTGTCTCTCCCTCCCTI							
GH6_51 →	GAGGGTGAAAAATGGAGC GGG CAGGAGGGAGCTGCTCCTGAGGGCCCTTCGGCCTCTCTGTCTCTCCCTCCCTI							
GH6_12 →	GAGGGTGAAAAATGGAGC GGG CAGGAGGGAGCTGCTCCTGAGGGCCCTTCGGCCTCTCTGTCTCTCCCTCCCTI							
GH6_35 →	GAGGGTGAAAAATGGAGC GGG CAGGAGGGAGCTGCTCCTGAGGGCCCTTCGGCCTCTCTGTCTCTCCCTCCCTI							
GH6_54 →	GAGGGTGAAAAATGGAGC GGG CAGGAGGGAGCTGCTCCTGAGGGCCCTTCGGCCTCTCTGTCTCTCCCTCCCTI							
GH6_50 →	GAGGGTGAAAAATGGAGC GGG CAGGAGGGAGCTGCTCCTGAGGGCCCTTCGGCCTCTCTGTCTCTCCCTCCCTI							
GH6_09 →							CTTCGGCCTCTCTGTCTCTCCCTCCCTI	
GH6_07 →							CTTCGGCCTCTCTGTCTCTCCCTCCCTI	
GH6_45 →								CCTI
GH6_08 →								CCTI
GH6_47 →								CCTI
GH6_26 →								CCTI
GH6_22 →								
GH6_33 →								
GH6_02 →								
GH6_42 →								
GH6_16 →								
GH6_46 →								
GH6_24 →								



[illegible]

Lampiran 3. Lanjutan

[illegible]

Lampiran 3. Lanjutan

[illegible]

Lampiran 3. Lanjutan

[illegible]

Lampiran 3. Lanjutan

	2410	2420	2430	2440	2450	2460	2470
	-TCCTT-CCTAaTAAKa--GASGAAATTGCATCGCATTGTCTGRKTAGGTGTCATTCTATTCT						
Gordon →	GTCCTTTCCTAATAA-AATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCT						
GH6_28 →	-TCCTT-CCTA-TAA-A--GAC▶						
GH6_27 →	-TCCTT-CC-AATAA-A--GAC▶						
GH6_41 →	-TCCTT-CC-AATAA-A--GAC▶						
GH6_20 →	-TCCTT-C-TAATAATA▶						
GH6_31 →	-TCCTT-C-TAATAATA▶						
GH6_30 →	GTCCTT-CCTAATAATA▶						
GH6_44 →	GTCCTT-CCTAATAATA▶						
GH6_19 →	-TCCTT-CCTA-TAAGA▶						
GH6_15 →	-TCCTT-CCTA-TAAGA▶						
GH6_04 →	GTCCTTTCCTAATAA-AATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGGTTAGGTGTCA▶						
GH6_18 →	-TCCTT-CCTA-TAAGA--GAC▶						
GH6_13 →	-TCCTT-CCTA-TAAGA--GAC▶						
GH6_10 →	GTCCTTTCCTAATAA-AATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGGTTAGGTGTCA▶						
GH6_03 →	GTCCTTTCCTAATAA-AATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGGTTAGGTGTCA▶						
GH6_53 →	-TCCTT-CCTA-TAAG▶						
GH6_17 →	-TCCTT-CCTA-TAAG▶						
GH6_43 →	GTCCTT-CCTATAAAGA▶						
GH6_51 →	-TCCTT-CCTA-TAAGA--GAC▶						
GH6_12 →	-TCCTT-CCTA-TAAG▶						
GH6_35 →	-TCCTT-CCNANAAA▶						
GH6_54 →	-TCCTT-CCTA-TAA-A▶						
GH6_50 →	GTCCTT-CCTATAAAGA▶						
GH6_09 →	GTCCTTTCCTAATAA-AATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCA▶						
GH6_07 →	GTCCTTTCCTAATAA-AATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGGTTAG▶						
GH6_45 →	GTCCTT-CCTAATAATA▶						
GH6_08 →	GTCCTTTCCTAATAA-AATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAG▶						
GH6_47 →	-TCCTT-C-TAATAATA▶						
GH6_26 →	GTCCTT-CC-AATAA-A--GAC▶						
GH6_22 →	-TCCTTCCNA-TAAN▶						
GH6_33 →	-TCCTTCCNA-TAAN▶						
GH6_02 →	GTCCTTTCCTAATAA-AATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGT▶						
GH6_42 →	-TCCTT-CCTA-TAA-A--GAC▶						
GH6_16 →	GTCCTTTCCTN-TAAAAAA▶						
GH6_46 →	-TCCTT-CC-AATAA-A--GAC▶						
GH6_24 →	-TCCTT-CCNANAAA▶						

Lampiran 3. Lanjutan

	2130	2140	2150	2160	2170	2180	2190	2200
	CTTGGCAGGAGCTGGAAGATGGCACCCCCGGGCTGGGCAGATCCTCAAGCAGACCTATGACAAATTTGACAC							
GH6_46 →	GGAGCTGGAAGATGGCACCCCCGGGCTGGGCAGATCCTCAAGCAGACCTATGACAAATTTGACAC							
GH6_49 →	GGAGCTGGAAGATGGCACCCCCGGGCTGGGCAGATCCTCAAGCAGACCTATGACAAATTTGACAC							
GH6_37 →	GGAGCTGGAAGATGGCACCCCCGGGCTGGGCAGATCCTCAAGCAGACCTATGACAAATTTGACAC							
GH6_39 →	GGAGCTGGAAGATGGCACCCCCGGGCTGGGCAGATCCTCAAGCAGACCTATGACAAATTTGACAC							
GH6_55 →	GGAGCTGGAAGATGGCACCCCCGGGCTGGGCAGATCCTCAAGCAGACCTATGACAAATTTGACAC							
GH6_05 →	GGAGCTGGAAGATGGCACCCCCGGGCTGGGCAGATCCTCAAGCAGACCTATGACAAATTTGACAC							
GH6_48 →	GGAGCTGGAAGATGGCACCCCCGGGCTGGGCAGATCCTCAAGCAGACCTATGACAAATTTGACAC							
GH6_11 →	AGCTGGAAGATGGCACCCCCGGGCTGGGCAGATCCTCAAGCAGACCTATGACAAATTTGACAC							
GH6_29 →	AGCTGGAAGATGGCACCCCCGGGCTGGGCAGATCCTCAAGCAGACCTATGACAAATTTGACAC							
GH6_01 →	AGCTGGAAGATGGCACCCCCGGGCTGGGCAGATCCTCAAGCAGACCTATGACAAATTTGACAC							
GH6_52 →	AGCTGGAAGATGGCACCCCCGGGCTGGGCAGATCCTCAAGCAGACCTATGACAAATTTGACAC							
GH6_34 ←	AGATGGAAGATGGCACCCCCGGGCTGGGCAGATCCTCAAGCAGACCTATGACAAATTTGACAC							
GH6_23 ←	AGATGGAAGATGGCACCCCCGGGCTGGGCAGATCCTCAAGCAGACCTATGACAAATTTGACAC							
GH6_25 →	AGCTGGAAGATGGCACCCCCGGGCTGGGCAGATCCTCAAGCAGACCTATGACAAATTTGACAC							
GH6_57 →	AGATGGAAGATGGCACCCCCGGGCTGGGCAGATCCTCAAGCAGACCTATGACAAATTTGACAC							
GH6_06 →	CGGGCTGGGCAGATCCTCAAGCAGACCTATGACAAATTTGACAC							
GH6_14 →	GGCTGGGCAGATCCTCAAGCAGACCTATGACAAATTTGACAC							
GH6_38 →	GCTGGGCAGATCCTCAAGCAGACCTATGACAAATTTGACAC							
GH6_58 →	GCTGGGCAGATCCTCAAGCAGACCTATGACAAATTTGACAC							
GH6_59 →	ACCTATGACAAATTTGACAC							
GH6_40 →	ACCTATGACAAATTTGACAC							
GH6_21 ←	TNACAC							
GH6_32 ←	TNACAC							
GH6_60 →	TGACAC							
	2200	2210	2220	2230	2240	2250	2260	2270
	CACAAACATGCGCAGTGACGACGCGCTGCTYAAGAACTACGGTCTGCTCTCCTGCTTCCGGAAGGACCTGCAT.							
GH6_46 →	CACAAACATGCGCAGTGACGACGCGCTGCTYAAGAACTACGGTCTGCTCTCCTGCTTCCGGAAGGACCTGCAT.							
GH6_49 →	CACAAACATGCGCAGTGACGACGCGCTGCTYAAGAACTACGGTCTGCTCTCCTGCTTCCGGAAGGACCTGCAT.							
GH6_37 →	CACAAACATGCGCAGTGACGACGCGCTGCTYAAGAACTACGGTCTGCTCTCCTGCTTCCGGAAGGACCTGCAT.							
GH6_39 →	CACAAACATGCGCAGTGACGACGCGCTGCTYAAGAACTACGGTCTGCTCTCCTGCTTCCGGAAGGACCTGCAT.							
GH6_55 →	CACAAACATGCGCAGTGACGACGCGCTGCTYAAGAACTACGGTCTGCTCTCCTGCTTCCGGAAGGACCTGCAT.							
GH6_05 →	CACAAACATGCGCAGTGACGACGCGCTGCTYAAGAACTACGGTCTGCTCTCCTGCTTCCGGAAGGACCTGCAT.							
GH6_48 →	CACAAACATGCGCAGTGACGACGCGCTGCTYAAGAACTACGGTCTGCTCTCCTGCTTCCGGAAGGACCTGCAT.							
GH6_11 →	CACAAACATGCGCAGTGACGACGCGCTGCTYAAGAACTACGGTCTGCTCTCCTGCTTCCGGAAGGACCTGCAT.							
GH6_29 →	CACAAACATGCGCAGTGACGACGCGCTGCTYAAGAACTACGGTCTGCTCTCCTGCTTCCGGAAGGACCTGCAT.							
GH6_01 →	CACAAACATGCGCAGTGACGACGCGCTGCTYAAGAACTACGGTCTGCTCTCCTGCTTCCGGAAGGACCTGCAT.							
GH6_52 →	CACAAACATGCGCAGTGACGACGCGCTGCTYAAGAACTACGGTCTGCTCTCCTGCTTCCGGAAGGACCTGCAT.							
GH6_34 ←	CACAAACATGCGCAGTGACGACGCGCTGCTYAAGAACTACGGTCTGCTCTCCTGCTTCCGGAAGGACCTGCAT.							
GH6_23 ←	CACAAACATGCGCAGTGACGACGCGCTGCTYAAGAACTACGGTCTGCTCTCCTGCTTCCGGAAGGACCTGCAT.							
GH6_25 →	CACAAACATGCGCAGTGACGACGCGCTGCTYAAGAACTACGGTCTGCTCTCCTGCTTCCGGAAGGACCTGCAT.							
GH6_57 →	CACAAACATGCGCAGTGACGACGCGCTGCTYAAGAACTACGGTCTGCTCTCCTGCTTCCGGAAGGACCTGCAT.							
GH6_06 →	CACAAACATGCGCAGTGACGACGCGCTGCTYAAGAACTACGGTCTGCTCTCCTGCTTCCGGAAGGACCTGCAT.							
GH6_14 →	CACAAACATGCGCAGTGACGACGCGCTGCTYAAGAACTACGGTCTGCTCTCCTGCTTCCGGAAGGACCTGCAT.							
GH6_38 →	CACAAACATGCGCAGTGACGACGCGCTGCTYAAGAACTACGGTCTGCTCTCCTGCTTCCGGAAGGACCTGCAT.							
GH6_58 →	CACAAACATGCGCAGTGACGACGCGCTGCTYAAGAACTACGGTCTGCTCTCCTGCTTCCGGAAGGACCTGCAT.							
GH6_59 →	CACAAACATGCGCAGTGACGACGCGCTGCTYAAGAACTACGGTCTGCTCTCCTGCTTCCGGAAGGACCTGCAT.							
GH6_40 →	CACAAACATGCGCAGTGACGACGCGCTGCTYAAGAACTACGGTCTGCTCTCCTGCTTCCGGAAGGACCTGCAT.							
GH6_21 ←	CACAAACATGCGCAGTGACGACGCGTTGCTTAAGAANTACGGTCTGCTCTCCTGCTTCCGGAAGGACCTGCAT.							
GH6_32 ←	CACAAACATGCGCAGTGACGACGCGTTGCTTAAGAANTACGGTCTGCTCTCCTGCTTCCGGAAGGACCTGCAT.							
GH6_60 →	CACAAACATGCGCAGTGACGACGCGTTGCTTAAGAANTACGGTCTGCTCTCCTGCTTCCGGAAGGACCTGCAT.							

Lampiran 3. Lanjutan

Genomic coordinates (nt) are shown at the top: 1270, 1280, 1290, 1300, 1310, 1320, 1330, 1340.

Reference sequence (top): CATAAGACGGAGACGTACCTGCGGGTCATGAAGTGCCGCCGCTTCGGGGAGGCCAGCTGTGCCCTTCTAGTTGC

Sample sequences (left margin) and their corresponding genomic coordinates (right margin) are shown. The sequences are color-coded to match the reference sequence (top):

- GH6_46 → CATAAGACGGAGACGTACCTGCGGGTCATGAAGTGCCGCCGCTTCGGGGAGGCCAGCTGTGCCCTTCTAGTTGC
- GH6_49 → CATAAGACGGAGACGTACCTGCGGGTCATGAAGTGCCGCCGCTTCGGGGAGGCCAGCTGTGCCCTTCTAGTTGC
- GH6_37 → CATAAGACGGAGACGTACCTGAGGGTCATGAAGTGCCGCCGCTTCGGGGAGGCCAGCTGTGCCCTTCTAGTTGC
- GH6_39 → CATAAGACGGAGACGTACCTGAGGGTCATGAAGTGCCGCCGCTTCGGGGAGGCCAGCTGTGCCCTTCTAGTTGC
- GH6_55 → CATAAGACGGAGACGTACCTGCGGGTCATGAAGTGCCGCCGCTTCGGGGAGGCCAGCTGTGCCCTTCTAGTTGC
- GH6_05 → CATAAGACGGAGACGTACCT-----
- GH6_48 → CATAAGACGGAGACGTACCTGAGGGTCATGAAGTGCCGCCGCTTCGGGGAGGCCAGCTGTGCCCTTCTAGTTGC
- GH6_11 → CATAAGACGGAGACGTACC-----
- GH6_29 → CATAAGACGGAGACGTACCTGCGGGTCATGAAGTGCCGCCGCTTCGGGGAGGCCAGCTGTGCCCTTCTAGTTGC
- GH6_01 → CATAAGACGGAGACGTACCTGCGGGTCATGAAGTGCCGCCGCTTCGGGGAGGCCAGCTGTGCCCTTCTAGTTGC
- GH6_52 → CATAAGACGGAGACGTACCTGAGGGTCATGAAGTGCCGCCGCTTCGGGGAGGCCAGCTGTGCCCTTCTAGTTGC
- GH6_34 ← CATAAGACGGAGACGTACCTGCGGGTCATGAAGTGCCGCCGCTTCGGGGAGGCCAGCTGTGCCCTTCTAGTTGC
- GH6_23 ← CATAAGACGGAGACGTACCTGCGGGTCATGAAGTGCCGCCGCTTCGGGGAGGCCAGCTGTGCCCTTCTAGTTGC
- GH6_25 → CATAAGACGGAGACGTACCTGAGGGTCATGAAGTGCCGCCGCTTCGGGGAGGCCAGCTGTGCCCTTCTAGTTGC
- GH6_57 → CATAAGACGGAGACGTACCTGCGGGTCATGAAGTGCCGCCGCTTCGGGGAGGCCAGCTGTGCCCTTCTAGTTGC
- GH6_06 → CATAAGACGGAGACGTACCTGAGGGTCATGAAGTGCCGCCGCTTCGGGGAGGCCAGCTGTGCCCTTCTAGTTGC
- GH6_14 → CATAAGACGGAGACGTACCTGCGGGTCATGAAGTGCCGCCGCTTCGGGGAGGCCAGCTGTGCCCTTCTAGTTGC
- GH6_38 → CATAAGACGGAGACGTACCTGAGGGTCATGAAGTGCCGCCGCTTCGGGGAGGCCAGCTGTGCCCTTCTAGTTGC
- GH6_58 → CATAAGACGGAGACGTACCTGAGGGTCATGAAGTGCCGCCGCTTCGGGGAGGCCAGCTGTGCCCTTCTAGTTGC
- GH6_59 → CATAAAACGGAGACGTACCTGCGGGTCATGAAGTGCCGCCGCTTCGGGGAGGCCAGCTGTGCCCTTCTAGTTGC
- GH6_40 → CATAAAACGGAGACGTACCTGCGGGTCATGAAGTGCCGCCGCTTCGGGGAGGCCAGCTGTGCCCTTCTAGTTGC
- GH6_21 ← CATAAGACGGAGACGTACCTGCGGGTCATGAAGTGCCGCCGCTTCGGGGAGGCCAGCTGTGCCCTTCTAGTTGC
- GH6_32 ← CATAAGACGGAGACGTACCTGCGGGTCATGAAGTGCCGCCGCTTCGGGGAGGCCAGCTGTGCCCTTCTAGTTGC
- GH6_60 → CATAAGACGGAGACGTACCTGCGGGTCATGAAGTGCCGCCGCTTCGGGGAGGCCAGCTGTGCCCTTCTAGTTGC
- GH6_36 → ITTGC

Genomic coordinates (nt) are shown at the bottom: 1340, 1350, 1360, 1370, 1380, 1390, 1400, 1410.

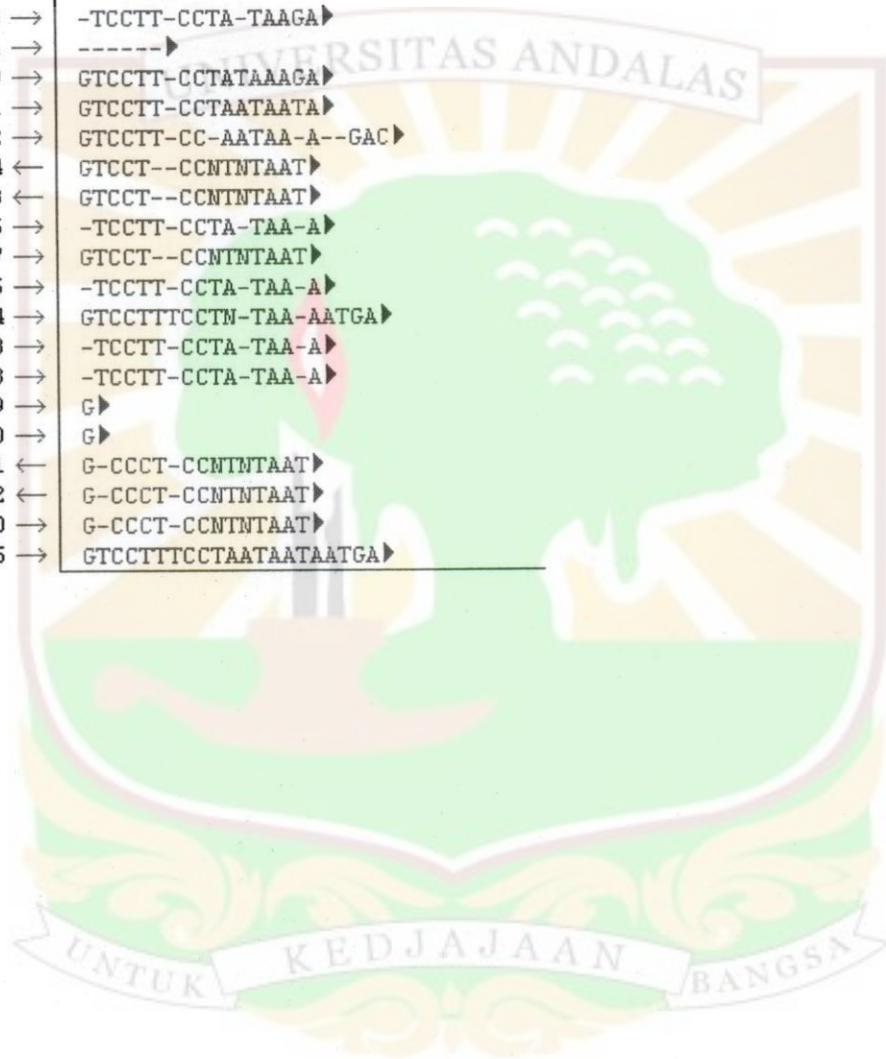
Reference sequence (bottom): TGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCTTCCCCCGTGCCTTCC-TTGACCC-TGGAA-GGTGCCACTCCC-ACT-TCC

Sample sequences (left margin) and their corresponding genomic coordinates (right margin) are shown. The sequences are color-coded to match the reference sequence (bottom):

- GH6_46 → TGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCTTCCCCCGTGCCTTCC-TTGACCC-TGGAA-GGTGCCACTCCC-ACT-TCC
- GH6_49 → TGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCTTCCCCCGTGCCTTCC-TTGACCC-TGGAA-GGTGCCACTCCC-ACT-TCC
- GH6_37 → TGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCTTCCCCCGTGCCTTCC-TTGACCC-TGGAA-GGTGCCACTCCC-ACT-TCC
- GH6_39 → TGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCTTCCCCCGTGCCTTCC-TTGACCC-TGGAA-GGTGCCACTCCC-ACT-TCC
- GH6_55 → TGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCTTCCCCCGTGCCTTCC-TTGACCC-TGGAA-GGTGCCACTCCC-ACT-TCC
- GH6_05 → TGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCTTCCCCCGTGCCTTCC-TTGACCC-TGGAA-GGTGCCACTCCC-ACT-TCC
- GH6_48 → TGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCTTCCCCCGTGCCTTCC-TTGACCC-TGGAA-GGTGCCACTCCC-ACT-TCC
- GH6_11 → TGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCTTCCCCCGTGCCTTCC-TTGACCC-TGGAA-GGTGCCACTCCC-ACT-TCC
- GH6_29 → TGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCTTCCCCCGTGCCTTCC-TTGACCC-TGGAA-GGTGCCACTCCC-ACT-TCC
- GH6_01 → TGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCTTCCCCCGTGCCTTCC-TTGACCC-TGGAA-GGTGCCACTCCC-ACT-TCC
- GH6_52 → TGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCTTCCCCCGTGCCTTCC-TTGACCC-TGGAA-GGTGCCACTCCC-ACT-TCC
- GH6_34 ← TGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCTTCCCCCGTGCCTTCC-TTGACCC-TGGAA-GGTGCCACTCCC-ACT-TCC
- GH6_23 ← TGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCTTCCCCCGTGCCTTCC-TTGACCC-TGGAA-GGTGCCACTCCC-ACT-TCC
- GH6_25 → TGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCTTCCCCCGTGCCTTCC-TTGACCC-TGGAA-GGTGCCACTCCC-ACT-TCC
- GH6_57 → TGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCTTCCCCCGTGCCTTCC-TTGACCC-TGGAA-GGTGCCACTCCC-ACT-TCC
- GH6_06 → TGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCTTCCCCCGTGCCTTCC-TTGACCC-TGGAA-GGTGCCACTCCC-ACT-TCC
- GH6_14 → TGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCTTCCCCCGTGCCTTCC-TTGACCC-TGGAA-GGTGCCACTCCC-ACT-TCC
- GH6_38 → TGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCTTCCCCCGTGCCTTCC-TTGACCC-TGGAA-GGTGCCACTCCC-ACT-TCC
- GH6_58 → TGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCTTCCCCCGTGCCTTCC-TTGACCC-TGGAA-GGTGCCACTCCC-ACT-TCC
- GH6_59 → TGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCTTCCCCCGTGCCTTCC-TTGACCC-TGGAA-GGTGCCACTCCC-ACT-TCC
- GH6_40 → TGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCTTCCCCCGTGCCTTCC-TTGACCC-TGGAA-GGTGCCACTCCC-ACT-TCC
- GH6_21 ← TGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCTTCCCCCGTGCCTTCC-TTGACCC-TGGAA-GGTGCCACTCCC-ACT-TCC
- GH6_32 ← TGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCTTCCCCCGTGCCTTCC-TTGACCC-TGGAA-GGTGCCACTCCC-ACT-TCC
- GH6_60 → TGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCTTCCCCCGTGCCTTCC-TTGACCC-TGGAA-GGTGCCACTCCC-ACT-TCC
- GH6_36 → TGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCTTCCCCCGTGCCTTCC-TTGACCC-TGGAA-GGTGCCACTCCC-ACT-TCC

Lampiran 3. Lanjutan

	2410	2420	2430	2440
	-TCCTT-CCTAaTAAkA--GASGAAATTGCATC			
GH6_46 →	-TCCTT-CC-AATAA-A--GAC▶			
GH6_49 →	-TCCTT-CCTA-TAA-A--GAC▶			
GH6_37 →	-TCCTT-CCTA-TAA-A▶			
GH6_39 →	GTCCTT-CC-AATAA-A--GAC▶			
GH6_55 →	-TCCTT-CCNANAAA▶			
GH6_05 →	-----▶			
GH6_48 →	-TCCTT-CCTA-TAAGA▶			
GH6_11 →	-----▶			
GH6_29 →	GTCCTT-CCTATAAAGA▶			
GH6_01 →	GTCCTT-CCTAATAATA▶			
GH6_52 →	GTCCTT-CC-AATAA-A--GAC▶			
GH6_34 ←	GTCCT--CCNTINTAAT▶			
GH6_23 ←	GTCCT--CCNTINTAAT▶			
GH6_25 →	-TCCTT-CCTA-TAA-A▶			
GH6_57 →	GTCCT--CCNTINTAAT▶			
GH6_06 →	-TCCTT-CCTA-TAA-A▶			
GH6_14 →	GTCCTTTCCTN-TAA-AATGA▶			
GH6_38 →	-TCCTT-CCTA-TAA-A▶			
GH6_58 →	-TCCTT-CCTA-TAA-A▶			
GH6_59 →	G▶			
GH6_40 →	G▶			
GH6_21 ←	G-CCCT-CCNTINTAAT▶			
GH6_32 ←	G-CCCT-CCNTINTAAT▶			
GH6_60 →	G-CCCT-CCNTINTAAT▶			
GH6_36 →	GTCCTTTCCTAATAATAATGA▶			



Lampiran 4. Sekuen oligonukleotida daerah ujung gen GH hasil amplifikasi menggunakan primer GH7L dan GH7R

	2420	2430	2440	2450	2460	2470	2480	2490
	AAATGAGGAGAT-GCAYCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC.							
Gordon →	AAATGAGGAAATTCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC.							
GH741 →	AGAT--CACCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC.							
GH738 →	AGAT--CACCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC.							
GH733 →	GAT-GCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC.							
GH742 →	GAT-GCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC.							
GH743 →	GAT-GCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC.							
GH708 →	GAT-GCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC.							
GH737 →	GAT-G-ATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC.							
GH739 →	GAT--CACCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC.							
GH740 →	GAT-GNATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC.							
GH734 →	GAT-G-ATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC.							
GH716 →	GAT-GC-TCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC.							
GH717 →	GAT-GC-TCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC.							
GH702 →	AT-GCACCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC.							
GH744 →	AT-GCACCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC.							
GH714 →	AT-GC-TCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC.							
GH705 →	AT-GCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGA----							
GH746 →	GCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC.							
GH706 →	GCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC.							
GH718 →	GCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC.							
GH745 →	GCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC.							
GH701 →	GCACCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC.							
GH707 →	C-TCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCARGACAGC.							
GH747 →	ATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC.							
GH735 →	ACCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC.							
GH748 →	CCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC.							
GH713 →	CCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC.							
GH720 →	TCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC.							
GH712 →	TCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC.							
GH723 →	TCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC.							
GH709 →	CGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC.							
GH749 →	CGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC.							
GH704 →	CGCATNGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC.							
GH703 →	CGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC.							
GH729 →	CATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC.							
GH750 →	CATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGC.							



Lampiran 4. Lanjutan

	2490	2500	2510	2520	2530	2540	2550	2560
	AGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGC							
Gordon →	AGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGC							
GH741 →	AGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCTGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGC							
GH738 →	AGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCTGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGC							
GH733 →	AGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCTGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGC							
GH742 →	AGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCTGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGC							
GH743 →	AGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCTGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGC							
GH708 →	AGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCTGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGC							
GH737 →	AGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCTGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGC							
GH739 →	AGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGC							
GH740 →	AGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCTG-----							
GH734 →	AGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGG-----							
GH716 →	AGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGC-----							
GH717 →	AGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGC-----							
GH702 →	AGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCTGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGC							
GH744 →	AGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCTGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGC							
GH714 →	AGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCTGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGC							
GH705 →	-----							
GH746 →	AGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCTGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGC							
GH706 →	AGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCTGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGC							
GH718 →	AGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCTGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGC							
GH745 →	AGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCTGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGC							
GH701 →	AGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGC							
GH707 →	AGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGG-----							
GH747 →	AGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTACGGGTACCCAGGTGC							
GH735 →	AGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTACGGGTACCCAGGTGC							
GH748 →	AGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCTGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGC							
GH713 →	AGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCTGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGC							
GH720 →	AGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCTGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGC							
GH712 →	AGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCTGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGC							
GH723 →	AGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGGATGCT-----							
GH709 →	AGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGC							
GH749 →	AGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGC							
GH704 →	AGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGC							
GH703 →	AGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGG-----							
GH729 →	AGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGC							
GH750 →	AGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGC							



Lampiran 4. Lanjutan

	2560	2570	2580	2590	2600	2610	2620	2630
	TGCTGAATAATTGACCCGGTTCCTCCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCTG							
Gordon →	TGCTGAAGAATTGACCCGGTTCCTCCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCTG							
GH741 →	TGCTGAATAATTGACCCGGTTCCTCCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCTG							
GH738 →	TGCTGAATAATTGACCCGGTTCCTCCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCTG							
GH733 →	TGCTGAATAATTGACCCGGTTCCTCCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCTG							
GH742 →	TGCTGAATAATTGACCCGGTTCCTCCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCTG							
GH743 →	TGCTGAATAATTGACCCGGTTCCTCCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCTG							
GH708 →	TGCTGAATAATTGACCCGGTTCCTCCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCTG							
GH737 →	TGCTGAATAATTGACCCGGTTCCTCCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCTG							
GH739 →	TGCTGAATAATTGACCCGGTTCCTCCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCTG							
GH740 →	-----							
GH734 →	-----							
GH716 →	-----							
GH717 →	-----							
GH702 →	TGCTGAATAATTGACCCGGTTCCTCCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCTG							
GH744 →	TGCTGAATAATTGACCCGGTTCCTCCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCTG							
GH714 →	TGCTGAATAATTGACCCGGTTCCTCCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCTG							
GH705 →	-----							
GH746 →	TGCTGAATAATTGACCCGGTTCCTCCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCTG							
GH706 →	TGCTGAATAATTGACCCGGTTCCTCCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCTG							
GH718 →	TGCTGAATAATTGACCCGGTTCCTCCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCTG							
GH745 →	TGCTGAATAATTGACCCGGTTCCTCCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCTG							
GH701 →	TGCTGAATAATTGACCCGGTTCCTCCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCTG							
GH707 →	-----							
GH747 →	TGCTGAAGAATTGACCCGGTTCCTCCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCTG							
GH735 →	TGCTGAAGAATTGACCCGGTTCCTCCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCTG							
GH748 →	TGCTGAATAATTGACCCGGTTCCTCCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCTG							
GH713 →	TGCTGAATAATTGACCCGGTTCCTCCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCTG							
GH720 →	TGCTGAATAATTGACCCGGTTCCTCCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCTG							
GH712 →	TGCTGAATAATTGACCCGGTTCCTCCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCTG							
GH723 →	-----							
GH709 →	TGCTGAATAATTGACCCGGTTCCTCCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCTG							
GH749 →	TGCTGAATAATTGACCCGGTTCCTCCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCTG							
GH704 →	TGCTGAATAATTGACCCGGTTCCTCCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCTG							
GH703 →	-----							
GH729 →	TGCTGAATAATTGACCCGGTTCCTCCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCTG							
GH750 →	TGCTGAATAATTGACCCGGTTCCTCCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCTG							



Lampiran 4. Lanjutan

	2630	2640	2650	2660	2670	2680	2690	2700
	CTGTCCACGGCCCTGGTYCTTAGTTCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA/							
Gordon →	CTGTCCACGGCCCTGGTTCCTTAGTTCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA/							
GH741 →	CTGTCCACGGCCCTGGTTCCTTAGTTCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA/							
GH738 →	CTGTCCACGGCCCTGGTTCCTTAGTTCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA/							
GH733 →	CTGTCCACGGCCCTGGTTCCTTAGTTCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA/							
GH742 →	CTGTCCACGGCCCTGGTTCCTTAGTTCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA/							
GH743 →	CTGTCCACGGCCCTGGTTCCTTAGTTCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA/							
GH708 →	CTGTCCACGGCCCTGGTTCCTTAGTTCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA/							
GH737 →	CTGTCCACGGCCCTGGTTCCTTAGTTCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA/							
GH739 →	CTGTCCACGNCCTGGTTCCTTAGTTCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA/							
GH740 →	-----							
GH734 →	-----							
GH716 →	-----							
GH717 →	-----							
GH702 →	CTGTCCACGGCCCTGGTTCCTTAGTTCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA/							
GH744 →	CTGTCCACGGCCCTGGTTCCTTAGTTCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA/							
GH714 →	CTGTCCACGGCCCTGGTYCTTAGTTCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA/							
GH705 →	-----							
GH746 →	CTGTCCACGSCCTGGTYCTTAGTTCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA/							
GH706 →	CTGTCCACGSCCTGGTYCTTAGTTCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA/							
GH718 →	CTGTCCACGGCCCTGGTTCCTTAGTTCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA/							
GH745 →	CTGTCCACGGCCCTGGTTCCTTAGTTCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA/							
GH701 →	CTGTCCACGGCCCTGGTTCCTTAGTTCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA/							
GH707 →	-----							
GH747 →	CTGTCCACGGCCCTGGTTCCTTAGTTCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA/							
GH735 →	CTGTCCACGGCCCTGGTTCCTTAGTTCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA/							
GH748 →	CTGTCCACGGCCCTGGTTCCTTAGTTCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA/							
GH713 →	CTGTCCACGGCCCTGGTTCCTTAGTTCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA/							
GH720 →	CTGTCCACGGCCCTGGTTCCTTAGTTCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA/							
GH712 →	CTGTCCACGGCCCTGGTTCCTTAGTTCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA/							
GH723 →	-----							
GH709 →	CTGTCCACGSCCTGGTTCCTTAGTTCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA/							
GH749 →	CTGTCCACGSCCTGGTTCCTTAGTTCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA/							
GH704 →	CTGTCCACGGCCCTGGTTCCTTAGTTCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA/							
GH703 →	-----							
GH729 →	CTGTCCACGNCCTGGTTCCTTAGTTCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA/							
GH750 →	CTGTCCACGNCCTGGTTCCTTAGTTCAGCCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA/							



Lampiran 4. Lanjutan

	2700	2710	2720	2730	2740	2750	2760	2770
	TCARTCCACYCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTtctCctccctcatcagcccaccaaaccctagcctcc							
Gordon →	TCAATCCACCCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTCTCTCCCTCCCTCATCAGCCCACCAAACCAAACCTAGCCTCC							
GH741 →	TCAGTCCCACTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTTTCTCCCTCCCTCATCAGC-----							
GH738 →	TCAGTCCCACTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTTTCTCCCTCCCTCATCAGC-----							
GH733 →	TCAGTCCCACTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTTTCTCCCTCCCTCATCAGCCCACCAAACCAAACCTAGCCTCC							
GH742 →	TCAGTCCCACTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTTTCTCCCTCCCTCATCAGCCCACCAAACCAAACCTAGCCTCC							
GH743 →	TCAGTCCCACTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTTTCTCCCTCCCTCATCAGCCCACCAAACCAAACCTAGCCTCC							
GH708 →	TCAGTCCCACTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTTTCTCCCTCCCTCATCAGCCCACCAAACCAAACCTAGCCTCC							
GH737 →	TCAATCCCACTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGT-----							
GH739 →	TCAATCCCACTCGCTAAAGTACTTGGAGC-----							
GH740 →	-----							
GH734 →	-----							
GH716 →	-----							
GH717 →	-----							
GH702 →	TCAGTCCCACTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTTTCTCCCTCCCTCATCAGCCCACCAAACCAAACCTAGCCTCC							
GH744 →	TCAGTCCCACTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTTTCTCCCTCCCTCATCAGCCCACCAAACCAAACCTAGCCTCC							
GH714 →	TCAATCCCACTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTTTCTCCCTCCCTCATCAGCCCACCAAACCAAACCTAGCCTCC							
GH705 →	-----							
GH746 →	TCAATCCCACTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTTTCTCCCTCCCTCATCAGCCCACCAAACCAAACCTAGCCTCC							
GH706 →	TCAATCCCACTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTTTCTCCCTCCCTCATCAGCCCACCAAACCAAACCTAGCCTCC							
GH718 →	TCANTCCCACTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTTTCTCCCTCCCTCATCAGCCCACCAAACCAAACCTAGCCTCC							
GH745 →	TCANTCCCACTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTTTCTCCCTCCCTCATCAGCCCACCAAACCAAACCTAGCCTCC							
GH701 →	TCAATCCCACTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTNT-----							
GH707 →	-----							
GH747 →	TCAATCCCACTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTTTCTCCCTCCCTCATCAGCCCACCAAACCAAACCTAGCCTCC							
GH735 →	TCAATCCCACTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTTTCTCCCTCCCTCATCAGCCCACCAAACCAAACCTAGCCTCC							
GH748 →	TCAGTCCCACTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTTTCTCCCTCCCTCATCAGCCCACCAAACCAAACCTAGCCTCC							
GH713 →	TCAGTCCCACTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTTTCTCCCTCCCTCATCAGCCCACCAAACCAAACCTAGCCTCC							
GH720 →	TCAATCCCACTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTTTCTCCCTCCCTCATCAGCCCACCAAACCAAACCTAGCCTCC							
GH712 →	TCAATCCCACTCGCTAAAGTACTTGGAGCG-----							
GH723 →	-----							
GH709 →	TCAATCCCACTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGT--CTCNCTCNCTCNCTN-C-----							
GH749 →	TCAATCCCACTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGT--CTCNCTCNCTCNCTN-C-----							
GH704 →	TCAATCCCACTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTN-----							
GH703 →	-----							
GH729 →	TCAATCCCACTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTTTCTCCCTCCCTCATCAGCCCACCAAACCAAACCTAGCCTCC							
GH750 →	TCAATCCCACTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTTTCTCCCTCCCTCATCAGCCCACCAAACCAAACCTAGCCTCC							

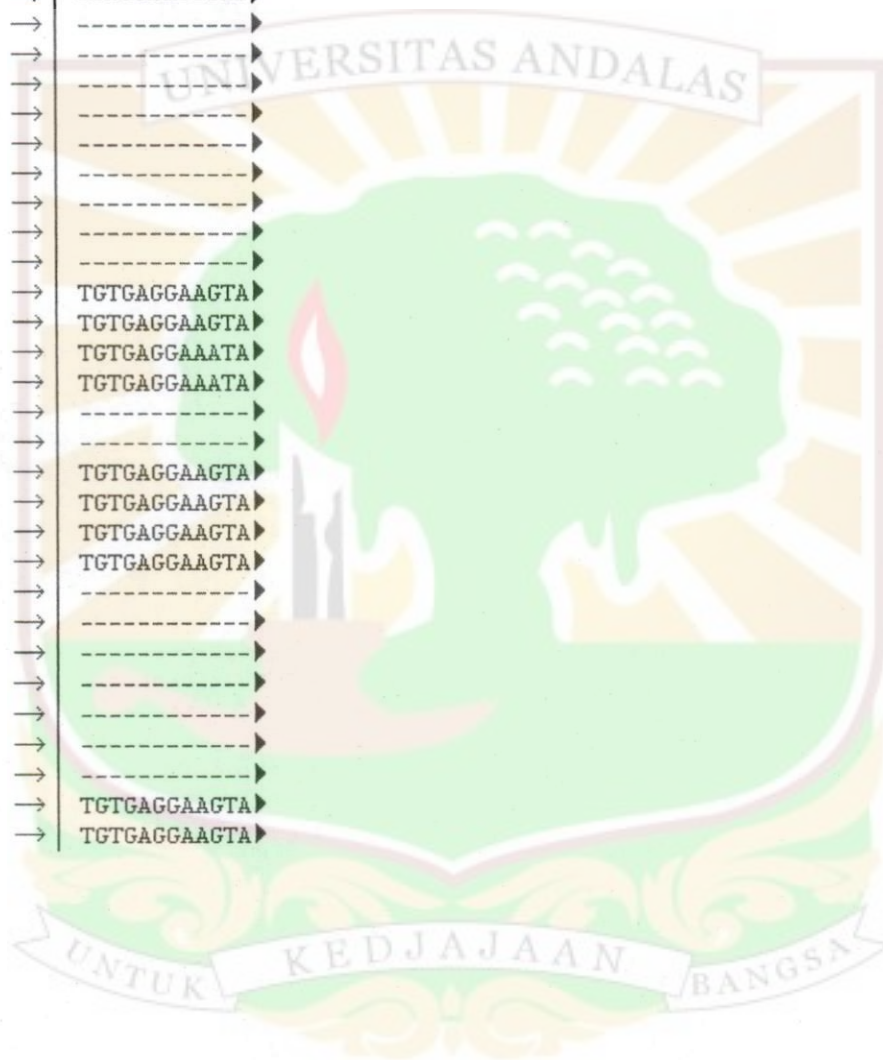


Lampiran 4. Lanjutan

	2770	2780	2790	2800	2810	2820	2830	2840
	ctccaagagtgggaagaaattaaagcaagataggctattaagtcagagggagagaaaaatgcctccaacatgtg							
Gordon →	CTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGTGCAGAGGGAGAGAAAAATGCCTCCAACATGTG							
GH741 →	-----							
GH738 →	-----							
GH733 →	CTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGTACAGAGGGAGAGAAAAATGCCTCCAACATGTG							
GH742 →	CTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGTACAGAGGGAGAGAAAAATGCCTCCAACATGTG							
GH743 →	CTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGTACAGAGGGAGAGAAAAATGCCTCCAACATGTG							
GH708 →	CTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGTACAGAGGGAGAGAAAAATGCCTCCAACATGTG							
GH737 →	-----							
GH739 →	-----							
GH740 →	-----							
GH734 →	-----							
GH716 →	-----							
GH717 →	-----							
GH702 →	CTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGC-----							
GH744 →	CTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGC-----							
GH714 →	-----							
GH705 →	-----							
GH746 →	CTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGTACAGAGGGAGAGAAAAATGCCTCCAACATGTG							
GH706 →	CTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGTACAGAGGGAGAGAAAAATGCCTCCAACATGTG							
GH718 →	CTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGTACAGAGGGAGAGAAAAATGCCTCCAACATGTG							
GH745 →	CTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGTACAGAGGGAGAGAAAAATGCCTCCAACATGTG							
GH701 →	-----							
GH707 →	-----							
GH747 →	CTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGTACAGAGGGAGAGAAAAATGCCTCCAACATGTG							
GH735 →	CTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGTACAGAGGGAGAGAAAAATGCCTCCAACATGTG							
GH748 →	CTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGTACAGAGGGAGAGAAAAATGCCTCCAACATGTG							
GH713 →	CTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGTACAGAGGGAGAGAAAAATGCCTCCAACATGTG							
GH720 →	-----							
GH712 →	-----							
GH723 →	-----							
GH709 →	-----							
GH749 →	-----							
GH704 →	-----							
GH703 →	-----							
GH729 →	CTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGTRCAGAGGGAGAGAAAAATGCCTCCAACATGTG							
GH750 →	CTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGTRCAGAGGGAGAGAAAAATGCCTCCAACATGTG							

Lampiran 4. Lanjutan

	2840	2850	2860
	tgtgaggaagtaATGAG		
Gordon →	TGTGAGGAAGTAATGAG▶		
GH741 →	-----▶		
GH738 →	-----▶		
GH733 →	TGTGAGGAAGTA▶		
GH742 →	TGTGAGGAAGTA▶		
GH743 →	TGTGAGGAAGTA▶		
GH708 →	TGTGAGGAAGTA▶		
GH737 →	-----▶		
GH739 →	-----▶		
GH740 →	-----▶		
GH734 →	-----▶		
GH716 →	-----▶		
GH717 →	-----▶		
GH702 →	-----▶		
GH744 →	-----▶		
GH714 →	-----▶		
GH705 →	-----▶		
GH746 →	TGTGAGGAAGTA▶		
GH706 →	TGTGAGGAAGTA▶		
GH718 →	TGTGAGGAAATA▶		
GH745 →	TGTGAGGAAATA▶		
GH701 →	-----▶		
GH707 →	-----▶		
GH747 →	TGTGAGGAAGTA▶		
GH735 →	TGTGAGGAAGTA▶		
GH748 →	TGTGAGGAAGTA▶		
GH713 →	TGTGAGGAAGTA▶		
GH720 →	-----▶		
GH712 →	-----▶		
GH723 →	-----▶		
GH709 →	-----▶		
GH749 →	-----▶		
GH704 →	-----▶		
GH703 →	-----▶		
GH729 →	TGTGAGGAAGTA▶		
GH750 →	TGTGAGGAAGTA▶		



Lampiran 4. Lanjutan

[illegible]

Lampiran 4. Lanjutan

25602570258025902600261026202630

TGCTGAATAAATTGACCCGGTTCTCTCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCCTG

GH751 → TGCTGAATAAATTGACCCGGTTCTCTCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCCTG

GH710 → TGCTGAATAAATTGACCCGGTTCTCTCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCCTG

GH752 → TGCTGAATAAATTGACCCGGTTCTCTCTGGGCCAGAAAGAAGCANGCANTCCCCCTTCTCTGTGACACACCCCTG

GH725 → TGCTGAATAAATTGACCCGGTTCTCTCTGGGCCAGAAAGAAGCANGCANTCCCCCTTCTCTGTGACACACCCCTG

GH728 → TGCTGAATAAATTGACCCGGTTCTCTCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCCTG

GH719 → TGCTGAATAAATTGACCCGGTTCTCTCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCCTG

GH711 → TGCTGAATAAATTGACCCGGTTCTCTCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCCTG

GH753 → TGCTGAATAAATTGACCCGGTTCTCTCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCCTG

GH726 → TGCTGAATAAATTGACCCGGTTCTCTCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCCTG

GH754 → TGCTGAATAAATTGACCCGGTTCTCTCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCCTG

GH724 → TGCTGAATAAATTGACCCGGTTCTCTCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCCTG

GH755 → TGCTGAATAAATTGACCCGGTTCTCTCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCCTG

GH727 → TGCTGAATAAATTGACCCGGTTCTCTCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCCTG

GH736 → TGCTGAATAAATTGACCCGGTTCTCTCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCCTG

GH721 → TGCTGAATAAATTGACCCGGTTCTCTCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCCTG

GH756 → TGCTGAATAAATTGACCCGGTTCTCTCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCCTG

GH757 → TGCTGAATAAATTGACCCGGTTCTCTCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCCTG

GH722 → TGCTGAATAAATTGACCCGGTTCTCTCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCCTG

GH732 → TGCTGAATAAATTGACCCGGTTCTCTCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCCTG

GH758 → TGCTGAATAAATTGACCCGGTTCTCTCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCCTG

GH759 → TGCTGAATAAATTGACCCGGTTCTCTCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCCTG

GH730 → TGCTGAATAAATTGACCCGGTTCTCTCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCCTG

GH731 → TGCTGAATAAATTGACCCGGTTCTCTCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCCTG

GH715 → TGCTGAATAAATTGACCCGGTTCTCTCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCCTG

GH760 → TGCTGAATAAATTGACCCGGTTCTCTCTGGGCCAGAAAGAAGCAGGCACATCCCCCTTCTCTGTGACACACCCCTG

26302640265026602670268026902700

CTGTCCACGGCCCTGGTYCTTAGTTCAGGCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA

GH751 → CTGTCCACGGCCCTGGTCCTTAGTTCAGGCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA

GH710 → CTGTCCACGGCCCTGGTCCTTAGTTCAGGCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA

GH752 → CTGTCCACGGCCCTGGTTCCTTAGTTCAGGCCCACTCATATGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA

GH725 → CTGTCCACGGCCCTGGTTCCTTAGTTCAGGCCCACTCATATGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA

GH728 → CTGTCCACGGCCCTGGTTCCTTAGTTCAGGCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA

GH719 → CTGTCCACGGCCCTGGTTCCTTAGTTCAGGCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA

GH711 → CTGTCCACGGCCCTGGTTCCTTAGTTCAGGCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA

GH753 → CTGTCCACGGCCCTGGTCCTTAGTTCAGGCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA

GH726 → CTGTCCACGGCCCTGGTTCCTTAGTTCAGGCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA

GH754 → CTGTCCACGGCCCTGGTTCCTTAGTTCAGGCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA

GH724 → CTGTCCACGGCCCTGGTTCCTTAGTTCAGGCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA

GH755 → CTGTCCACGGCCCTGGTTCCTTAGTTCAGGCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA

GH727 → CTGTCCACGGCCCTGGTTCCTTAGTTCAGGCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA

GH736 → CTGTCCACGGCCCTGGTTCCTTAGTTCAGGCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA

GH721 → CTGTCCACGGCCCTGGTTCCTTAGTTCAGGCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA

GH756 → CTGTCCACGGCCCTGGTTCCTTAGTTCAGGCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA

GH757 → CTGTCCACGGCCCTGGTTCCTTAGTTCAGGCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA

GH722 → CTGTCCACGGCCCTGGTTCCTTAGTTCAGGCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA

GH732 → CTGTCCACGGCCCTGGTTCCTTAGTTCAGGCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA

GH758 → CTGTCCACGGCCCTGGTTCCTTAGTTCAGGCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA

GH759 → CTGTCCACGGCCCTGGTTCCTTAGTTCAGGCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA

GH730 → CTGTCCACGGCCCTGGTTCCTTAGTTCAGGCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA

GH731 → CTGTCCACGGCCCTGGTTCCTTAGTTCAGGCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA

GH715 → CTGTCCACGNCCTGGTTCCTTAGTTCAGGCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA

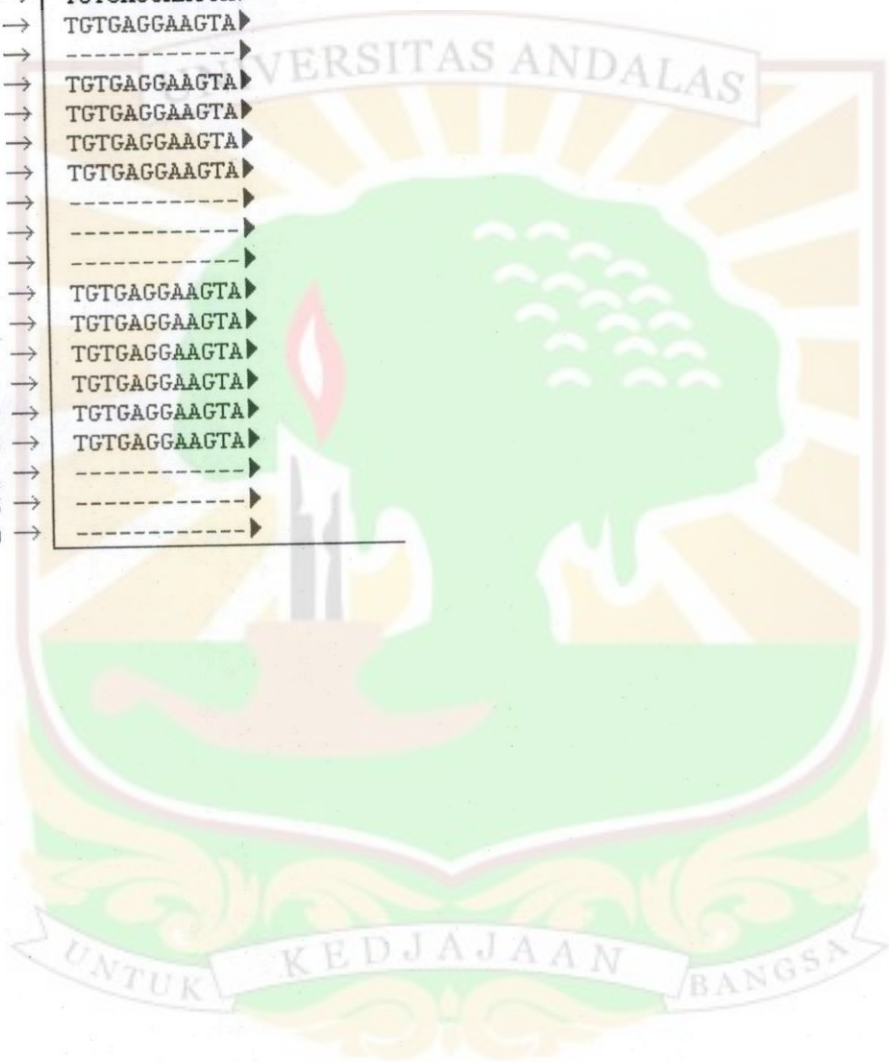
GH760 → CTGTCCACGNCCTGGTTCCTTAGTTCAGGCCCACTCATAGGACACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCCTTCA

Lampiran 4. Lanjutan

	2700	2710	2720	2730	2740	2750	2760	2770
	TCARTCCACYCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTTCTCCCTCCCTCATCAGCCACCAAACCAAACCTAGCCTC							
GH751 →	TCAGTCCCACTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTTTCTCCCTCCCTCATCAGCCACCAAACCAAACCTAGCCTC							
GH710 →	TCAGTCCCACTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTTTCTCCCTCCCTCATCAGCCACCAAACCAAACCTAGCCTC							
GH752 →	TCAATCCCACCCGCTAAAGTACTTGGAGCGG--TCTCCCTCCCTCATCAGCCACCAAACCAAACCTAGCCTC							
GH725 →	TCAATCCCACCCGCTAAAGTACTTGGAGCGG--TCTCCCTCCCTCATCAGCCACCAAACCAAACCTAGCCTC							
GH728 →	TCAATCCCACCTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGT-----							
GH719 →	TCAATCCCACCCGCTAAAGTACTTGGAGCGGT-----							
GH711 →	TCAGTCCCACTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTTTCTCCCTCCCTCATCAGCCACCAAACCAAACCTAGCCTC							
GH753 →	TCAGTCCCACTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTTTCTCCCTCCCTCATCAGCCACCAAACCAAACCTAGCCTC							
GH726 →	TCAATCCCACCTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGT-----							
GH754 →	TCAGTCCCACTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTTTCTCCCTCCCTCATCAGCCACCAAACCAAACCTAGCCTC							
GH724 →	TCAGTCCCACTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTTTCTCCCTCCCTCATCAGCCACCAAACCAAACCTAGCCTC							
GH755 →	TCAGTCCCACTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTTTCTCCCTCCCTCATCAGCCACCAAACCAAACCTAGCCTC							
GH727 →	TCAGTCCCACTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTTTCTCCCTCCCTCATCAGCCACCAAACCAAACCTAGCCTC							
GH736 →	TCAATCCCACCCGCTAAAG-----							
GH721 →	TCAGTCCCACTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTTTCTCCCTCCCTCATCAGCCACCA-----							
GH756 →	TCAGTCCCACTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTTTCTCCCTCCCTCATCAGCCACCA-----							
GH757 →	TCAGTCCCACTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTTTCTCCCTCCCTCATCAGCCACCAAACCAAACCTAGCCTC							
GH722 →	TCAGTCCCACTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTTTCTCCCTCCCTCATCAGCCACCAAACCAAACCTAGCCTC							
GH732 →	TCANTCCCACTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTTTCTCCCTCCCTCATCAGCCACCAAACCAAACCTAGCCTC							
GH758 →	TCANTCCCACTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTTTCTCCCTCCCTCATCAGCCACCAAACCAAACCTAGCCTC							
GH759 →	TCAATCCCACCTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTTTCTCCCTCCCTCATCAGCCACCAAACCAAACCTAGCCTC							
GH730 →	TCAATCCCACCTCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTTTCTCCCTCCCTCATCAGCCACCAAACCAAACCTAGCCTC							
GH731 →	TCAATCCCACCCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTTTCT-----							
GH715 →	TCAATCCCACCCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTTTCTCCCTCCCTCATCAGCCACCA-----							
GH760 →	TCAATCCCACCCGCTAAAGTACTTGGAGCGGTTTCTCCCTCCCTCATCAGCCACCA-----							
	2770	2780	2790	2800	2810	2820	2830	2840
	ctccaagagtgggaagaaattaaagcaagataggctattaagtagagaggagagaaatgcctccaacatgt							
GH751 →	CTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGTACAGAGGGAGAGAAATGCCTCCAACATGT							
GH710 →	CTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGTACAGAGGGAGAGAAATGCCTCCAACATGT							
GH752 →	CTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGTACAGAGGGAGAGAAATGCCTCCAACATGT							
GH725 →	CTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGTACAGAGGGAGAGAAATGCCTCCAACATGT							
GH728 →	-----							
GH719 →	-----							
GH711 →	CTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGTACAGAGGGAGAGAAATGCCTCCAACATGT							
GH753 →	CTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGTACAGAGGGAGAGAAATGCCTCCAACATGT							
GH726 →	-----							
GH754 →	CTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGTACAGAGGGAGAGAAATGCCTCCAACATGT							
GH724 →	CTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGTACAGAGGGAGAGAAATGCCTCCAACATGT							
GH755 →	CTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGTACAGAGGGAGAGAAATGCCTCCAACATGT							
GH727 →	CTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGTACAGAGGGAGAGAAATGCCTCCAACATGT							
GH736 →	-----							
GH721 →	-----							
GH756 →	-----							
GH757 →	CTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGTACAGAGGGAGAGAAATGCCTCCAACATGT							
GH722 →	CTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGTACAGAGGGAGAGAAATGCCTCCAACATGT							
GH732 →	CTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGTRCAGAGGGAGAGAAATGCCTCCAACATGT							
GH758 →	CTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGTRCAGAGGGAGAGAAATGCCTCCAACATGT							
GH759 →	CTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGTRCAGAGGGAGAGAAATGCCTCCAACATGT							
GH730 →	CTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGTRCAGAGGGAGAGAAATGCCTCCAACATGT							
GH731 →	-----							
GH715 →	-----							
GH760 →	-----							

Lampiran 4. Lanjutan

	2840	2850	2860
	tgtgaggaagtaATGAG		
GH751 →	TGTGAGGAAGTA▶		
GH710 →	TGTGAGGAAGTA▶		
GH752 →	TGTGAGGAAGTA▶		
GH725 →	TGTGAGGAAGTA▶		
GH728 →	-----▶		
GH719 →	-----▶		
GH711 →	TGTGAGGAAGTA▶		
GH753 →	TGTGAGGAAGTA▶		
GH726 →	-----▶		
GH754 →	TGTGAGGAAGTA▶		
GH724 →	TGTGAGGAAGTA▶		
GH755 →	TGTGAGGAAGTA▶		
GH727 →	TGTGAGGAAGTA▶		
GH736 →	-----▶		
GH721 →	-----▶		
GH756 →	-----▶		
GH757 →	TGTGAGGAAGTA▶		
GH722 →	TGTGAGGAAGTA▶		
GH732 →	TGTGAGGAAGTA▶		
GH758 →	TGTGAGGAAGTA▶		
GH759 →	TGTGAGGAAGTA▶		
GH730 →	TGTGAGGAAGTA▶		
GH731 →	-----▶		
GH715 →	-----▶		
GH760 →	-----▶		



Lampiran 5. Frekuensi alel GH(L) dan GH(V) pada beberapa breed sapi

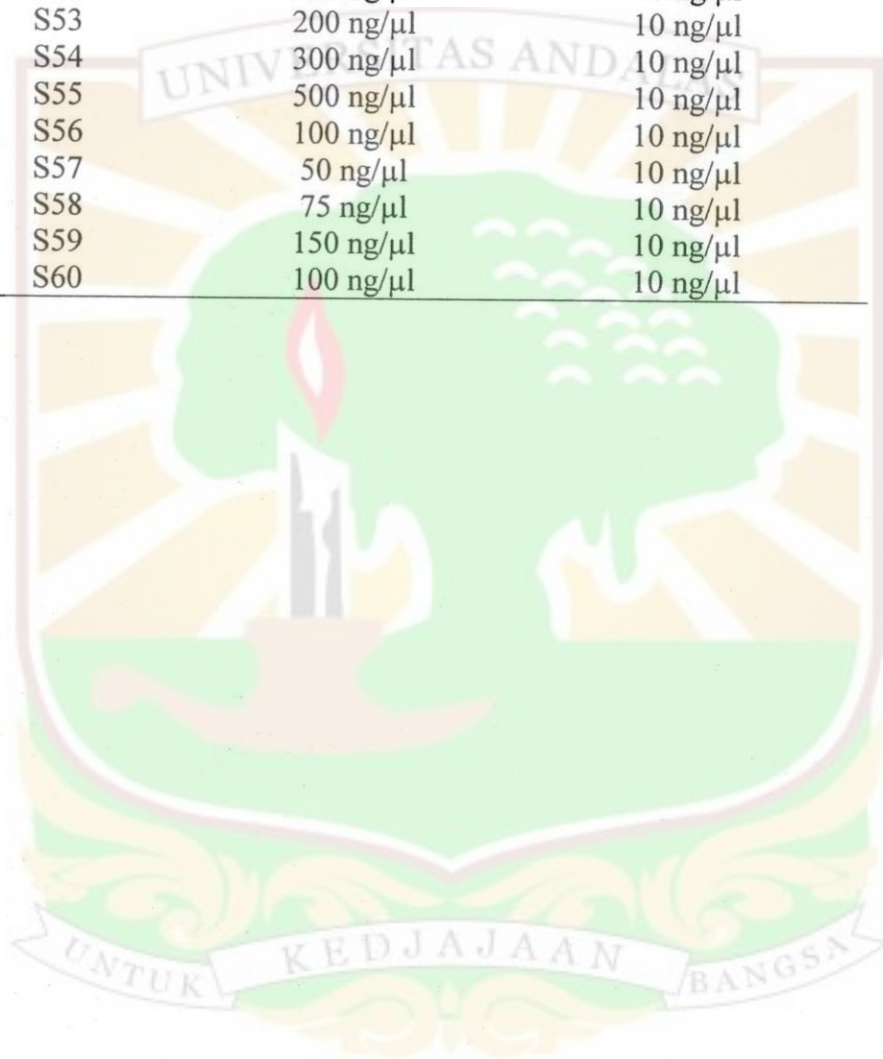
Breed	Allel		Sumber
	L	V	
Danis Jersey	0,51	0,49	Sorensen et al. (2002)
Jersey	0,56	0,44	Lucy et al. (1993)
Skvak Simental	0,56	0,44	Chrenek et al. 1991
Frisian Polish	0,64	0,36	Grochowska et al. (2001)
Yakutian	0,66	0,34	lazebnaya et al. (2010)
Limousine	0,67	0,33	Dybus et al. (2003)
Limousine	0,67	0,33	Abbasi et al. (1999)
Simental	0,68	0,32	Dybus et al. (1994)
Bavarian Simental	0,68	0,32	Schlee et al. 1994a
Piemontese	0,72	0,28	Di Stasio et al. (2002)
Jersey	0,76	0,24	Sabour et al. (1997)
Ayrshire	0,79	0,21	Lucy et al. (1993)
Angus	0,80	0,20	Chikuni et al. 1991
German Black and White	0,80	0,20	Schlee et al. (1994b)
Polish Black and White	0,81	0,19	Dybus et al., (2002)
Holstein-Friesian Australia	0,82	0,18	Syariflou et al. (2000)
Simental	0,82	0,18	Luciana et al. (2003)
Podolian	0,85	0,15	Dario et al. (2005)
Danis Red	0,85	0,15	Sorensen et al. (2002)
Holstein	0,86	0,14	Lee et al. (1996)
Bavarian & Tyrolean Brown	0,90	0,10	Schelee et al. (1994)
Candhim	0,90	0,10	Kemenes et al. (1999)
Holstein	0,91	0,09	Sabour et al. (1997)
Holstein	0,91	0,09	Yao et al., (1996)
Guemsey	0,92	0,08	Lucy et al. (1993)
Holstein	0,92	0,08	Vukasinovic et al. (1999)
Holstein	0,93	0,07	Lucy et al. (1993)
Danis Holstein	0,93	0,07	Sorensen et al. (2002)
Holstein Iran	0,94	0,06	Sadhegi et al. 2008
Zebu Sahiwal	0,96	0,04	Mirta et al. (1995)
Santa Getrudis	0,97	0,03	Kemenes et al. 1999
Pesisir	0,99	0,01	Jakaria (2008)
Pesisir	1,00	0,00	Penelitian ini
Brown Swiss	1,00	0,00	Lucy et al. (1993)
Gyr	1,00	0,00	Kemenes et al. 1999
Gyr Brazilia	1,00	0,00	de Mattos et al. (2004)
Guzera	1,00	0,00	Kemenes et al. 1999
Nelore	1,00	0,00	Kemenes et al. 1999
Iranian Sistani & Dashtyari	1,00	0,00	Masoudi et al. (2002)

Lampiran 6. Konsentrasi DNA Sampel dan Konsentrasi Sampel Untuk PCR

Sampel	Konsentrasi	Konsentrasi Untuk PCR
S01	50 ng/μl	10 ng/μl
S02	400 ng/μl	10 ng/μl
S03	200 ng/μl	10 ng/μl
S04	150 ng/μl	10 ng/μl
S05	150 ng/μl	10 ng/μl
S06	250 ng/μl	10 ng/μl
S07	300 ng/μl	10 ng/μl
S08	400 ng/μl	10 ng/μl
S09	400 ng/μl	10 ng/μl
S10	300 ng/μl	10 ng/μl
S11	300 ng/μl	10 ng/μl
S12	350 ng/μl	10 ng/μl
S13	350 ng/μl	10 ng/μl
S14	350 ng/μl	10 ng/μl
S15	400 ng/μl	10 ng/μl
S16	400 ng/μl	10 ng/μl
S17	50 ng/μl	10 ng/μl
S18	100 ng/μl	10 ng/μl
S19	100 ng/μl	10 ng/μl
S20	50 ng/μl	10 ng/μl
S21	50 ng/μl	10 ng/μl
S22	300 ng/μl	10 ng/μl
S23	50 ng/μl	10 ng/μl
S24	100 ng/μl	10 ng/μl
S25	400 ng/μl	10 ng/μl
S26	50 ng/μl	10 ng/μl
S27	50 ng/μl	10 ng/μl
S28	150 ng/μl	10 ng/μl
S29	100 ng/μl	10 ng/μl
S30	150 ng/μl	10 ng/μl
S31	500 ng/μl	10 ng/μl
S32	100 ng/μl	10 ng/μl
S33	200 ng/μl	10 ng/μl
S34	250 ng/μl	10 ng/μl
S35	100 ng/μl	10 ng/μl
S36	200 ng/μl	10 ng/μl
S37	400 ng/μl	10 ng/μl
S38	300 ng/μl	10 ng/μl
S39	100 ng/μl	10 ng/μl
S40	200 ng/μl	10 ng/μl
S41	500 ng/μl	10 ng/μl
S42	200 ng/μl	10 ng/μl
S43	200 ng/μl	10 ng/μl
S44	100 ng/μl	10 ng/μl
S45	150 ng/μl	10 ng/μl

Lampiran 6. Lanjutan

Sampel	Konsentrasi	Konsentrasi Untuk PCR
S46	100 ng/μl	10 ng/μl
S47	100 ng/μl	10 ng/μl
S48	100 ng/μl	10 ng/μl
S49	200 ng/μl	10 ng/μl
S50	150 ng/μl	10 ng/μl
S51	50 ng/μl	10 ng/μl
S52	100 ng/μl	10 ng/μl
S53	200 ng/μl	10 ng/μl
S54	300 ng/μl	10 ng/μl
S55	500 ng/μl	10 ng/μl
S56	100 ng/μl	10 ng/μl
S57	50 ng/μl	10 ng/μl
S58	75 ng/μl	10 ng/μl
S59	150 ng/μl	10 ng/μl
S60	100 ng/μl	10 ng/μl



Lampiran 7. Uji χ^2 antara dua kelompok berat badan dengan polimorfisme GH pada fragmen GH4

Posisi	Kelompok Sapi	Genotip		Nilai χ^2	
1419	T	Delesi	Total	Nilai χ^2	Prob.
Berat	14	1	15	0.0110	0.9163
Ringan	12	1	13		
Total	29	2	28		
1467	-	Inseri T	Total		
Berat	27	2	29	0.3159	0.5741
Ringan	27	1	28		
	54	3	57		
1482-	GG	AA	Total		
Berat	15	8	23	0.0933	0.7600
Ringan	14	9	23		
	29	17	56		
1547	C	T	Total		
Berat	27	2	39	0.3159	0.5741
Ringan	27	1	28		
	54	3	57		
1578	C	T	Total		
Berat	23	3	26	0.0201	0.8873
Ringan	26	3	29		
	49	6	55		

Lampiran 8. Uji χ^2 antara dua kelompok berat badan dengan polimorfisme GH pada fragmen GH5

Posisi	Kelompok	Genotip			Nilai χ^2	
1743	C	Delesi	Total	Nilai χ^2	Prob.	
	Berat	1	2	1.4063	0.2357	
	Ringan	7	8			
	Total	8	10			
1745	T	Delesi	Total			
	Berat	2	2	0.5432	0.4611	
	Ringan	7	9			
		9	11			
1749	T	Delesi	Total			
	Berat	2	5	0.7875	0.3749	
	Ringan	10	16			
		12	21			
1750	T	Delesi	Total			
	Berat	4	5	0.1750	0.6757	
	Ringan	14	16			
		18	21			
1753	G	Delesi	Total			
	Berat	8	8	0.8183	0.3657	
	Ringan	19	21			
		27	29			
1754	-	Delesi C	Total			
	Berat	2	8	0.1880	0.6646	
	Ringan	7	21			
		9	29			
1915	C	G	Total			
	Berat	11	22	0.1502	0.6983	
	Ringan	15	27			
		26	49			

Lampiran 8. Lanjutan

Posisi	Kelompok		Genotip		Nilai χ^2	
1930	C	G	Total	Nilai χ^2	Prob.	
Berat	11	11	22	0.1502	0.6983	
Ringan	15	12	27			
	26	23	49			
1980	T	C	Total			
Berat	17	6	23	3.3635	0.0667	
Ringan	12	13	25			
	29	19	48			
2025	A	G	Total			
Berat	22	4	26	3.1947	0.0739	
Ringan	17	10	27			
	29	14	53			

Lampiran 9. Uji χ^2 antara dua kelompok berat badan dengan polimorfisme GH pada fragmen GH6

Posisi	Kelompok Sapi	Genotip			Nilai χ^2	
2230		C	T	Total	Nilai χ^2	$\chi^2_{0,05;1}$
	Berat	15	1	16	0.0022	0.9624
	Ringan	14	1	15		
	Total	29	2	31		
2291		A	C	Total		
	Berat	8	21	29	0.0162	0.8988
	Ringan	7	17	24		
		15	38	53		
2379		GG	AA	Total		
	Berat	27	2	29	0,3159	0,5741
	Ringan	27	1	28		
		54	3	46		
2386		C	T	Total		
	Berat	27	2	29	0,3159	0,5741
	Ringan	27	1	28		
		54	3	57		
2391		C	T	Total		
	Berat	27	2	29	0,3159	0,5741
	Ringan	27	1	28		
		54	3	57		

Lampiran 10. Uji χ^2 antara dua kelompok berat badan dengan polimorfisme GH pada fragmen GH7

Posisi	Kelompok Sapi	Genotip		Nilai χ^2	
2429	A	G	Total	Nilai χ^2	Prob
	Berat	0	9	9	1.6071
	Ringan	1	5	6	0.2049
	Total	1	14	15	
2433	G	Delesi	Total		
	Berat	9	3	12	2.3529
	Ringan	8	0	8	0.1250
		17	3	20	
2435	A	Delesi	Total		
	Berat	14	1	15	3.1667
	Ringan	6	4	10	0.0512
		20	5	25	
2436	T	C	Total		
	Berat	9	6	15	1.1669
	Ringan	11	3	14	0.2800
		20	9	29	
2537	G	T	Total		
	Berat	8	14	22	0.0366
	Ringan	9	14	23	0.8482
		17	28	45	
2567	G	T	Total		
	Berat	2	26	28	1.7829
	Ringan	0	24	24	0.1818
		2	50	52	
2647	T	C	Total		
	Berat	8	14	22	0.0010
	Ringan	7	12	19	0.9747
		15	26	41	

Lampiran 10. Lanjutan

Posisi	Kelompok Sapi	Genotip		Nilai χ^2		
2703	A	G	Total	Nilai χ^2	Prob	
	Berat	13	14	27	0.5828	0.4452
	Ringan	13	9	22		
		26	23	49		
2710	C	T	Total			
	Berat	10	18	28	0.0048	0.9448
	Ringan	8	15	23		
		18	33	51		
2732	C	T	Total			
	Berat	3	21	24	2.1622	0.1414
	Ringan	0	16	16		
		3	37	40		
2732	C	Delesi	Total			
	Berat	23	1	24	0.0877	0.7671
	Ringan	15	1	16		
		38	2	40		